

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Л.А.ОСТЕРМАН

**ИССЛЕДОВАНИЕ
БИОЛОГИЧЕСКИХ
МАКРОМОЛЕКУЛ
ЭЛЕКТРОФОКУСИРОВАНИЕМ
ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ
И РАДИОИЗОТОПНЫМИ
МЕТОДАМИ**



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

Москва 1983

ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) — один из наиболее эффективных и широко распространенных в настоящее время методов фракционирования и очистки белков. Его используют как на завершающих стадиях эксперимента (аналитический вариант), так и при обработке исходного клеточного гомогената (препаративный вариант). Многие методические приемы, например приготовление гелей полиакриламида и агарозы, окраска белковых полос, элюция белков из гелей и др., роднят ИЭФ с электрофорезом белков, подробно рассмотренным в предыдущей книге [Остерман, 1981]. Фракционирование белков при ИЭФ производится в электрическом поле с помощью тех же приборов, которые используются для электрофореза. Ниже при изложении материала предполагается, что читатель уже знаком с этими методами и аппаратурой.

Вместе с тем между электрофорезом и ИЭФ существуют важные различия, поскольку фракционирование белков при ИЭФ идет по совсем иному принципу. В процессе электрофореза белки разделяются вследствие различия скоростей их миграции в электрическом поле, которые обусловлены суммарными электрическими зарядами белков в среде с неизменным рН и их размерами, определяющими степень торможения белков о сетку геля. При ИЭФ параметром фракционирования служит значение изоэлектрической точки (pI) белка как цвиттериона.

В первой главе подробно описан принцип метода ИЭФ, т. е. характер миграции белков под действием электрического поля в среде с изменяющейся вдоль пути этой миграции величиной рН («градиент рН»). Достаточно детально рассмотрен и способ образования градиента рН, в частности свойства «амфолитов» — веществ, формирующих этот градиент под действием электрического поля. Такое рассмотрение необходимо для понимания описанных ниже экспериментальных подходов и позволяет сразу же выявить некоторые уязвимые места метода, игнорирование которых может привести к артефактам. Вторая глава посвящена разбору аналитических вариантов ИЭФ, сгруппированных по типу используемых гелей: горизонтальные пластины полиакриламидного геля (ПААГ), вертикально стоящие трубки ПААГ и горизонтальные пластины агарозы. В отдельную главу выделен чрезвычайно плодотворный аналитический

О Фарреллом. Там же рассмотрены более поздние модификации этого метода. Четвертая глава посвящена основным приемам препаративного ИЭФ белков. Наконец, в качестве дополнения в главе пятой приведено краткое описание принципа возможностей метода изотахофореза. Для фракционирования биополимеров он почти не применяется, поэтому мы ограничимся лишь беглым знакомством с ним.

Глава 1

СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Вначале рассмотрим общие характерные особенности метода, чтобы затем обратиться к его техническим деталям и вариантам.

Смесь белков вносят в трубку или в объем пластины, заполненные электропроводящей жидкостью. Возможность конвекции устраняют либо полимеризацией в этой жидкости сетки ПААГ или агарозы, либо помещением в нее гранулированного сефадекса, либо, наконец, образованием в жидкости градиента плотности раствора сахарозы. Вдоль трубки или одного из линейных размеров пластины в электропроводящей жидкости создают и поддерживают линейный градиент pH в определенном наперед выбранном интервале значений. Жидкость обладает буферными свойствами, так что установившиеся значения pH вдоль градиента не изменяются в присутствии фракционируемых белков.

Ниже подробно описано, каким образом выполняются все эти условия и что это за жидкость, но сначала проанализируем поведение растворенных в ней белков после того, как к концам трубки или противоположным торцам пластины присоединил источник напряжения.

Протекание тока через жидкость сопровождается установлением электрического поля, действующего на оказавшиеся в нем белковые молекулы. Это воздействие приводит к их миграции вдоль поля по направлению к аноду или катоду в зависимости от знака суммарного электрического заряда каждой молекулы, подобно тому как это происходит при электрофорезе. Скорость миграции пропорциональна напряженности электрического поля и электрофоретической подвижности белка. Последняя, как известно, зависит от отношения суммарного заряда к линейному размеру белковой молекулы.

Однако на этом сходство с электрофорезом кончается. Отметим, прежде всего, что трение молекул белков о сетку геля сефадекса или вязкий раствор сахарозы никакой роли в их фракционировании не играет. С ним приходится мириться в силу не

векции в жидкости, но не более того. Поэтому для ИЭФ используют крупнопористый ПААГ, агарозу и сефадекс. Последний, в отличие от ПААГ, должен быть достаточно мелкопористым, для того чтобы молекулы белка не проникали внутрь его гранул, а мигрировали в жидкости между ними. Размер белковых молекул, как уже упоминалось, вообще не имеет значения для их фракционирования; важно только значение pI . Рассмотрим качественно процесс фракционирования смеси белков в стационарном линейном градиенте pH электропроводящей жидкости, полагая, что характерные для всех белков значения pI лежат внутри этого градиента.

МИГРАЦИЯ БЕЛКОВ В ГРАДИЕНТЕ pH

Проанализируем для начала поведение белковых молекул, которые в некоторый момент времени находятся в таком участке градиента, где $pH < pI$, т. е. в кислой для этих белков среде. Очевидно, что они заряжены положительно и под влиянием поля должны мигрировать к катоду. До сих пор ничего не было сказано о направлении изменения pH вдоль градиента. Его создают таким образом, чтобы pH увеличивался в направлении от анода к катоду. По мере движения положительно заряженные белковые молекулы будут переходить в области градиента со все более высокими значениями pH . В силу этого их положительный заряд будет уменьшаться, а миграция — замедляться. Однако до тех пор, пока pH окружающей их среды меньше pI , движение будет продолжаться. Молекулы белка остановятся, лишь достигнув участка градиента, где для них $pH = pI$. Здесь они утрачивают заряд, так что электрическое поле на них больше не действует.

Аналогичный процесс, но происходящий в обратном направлении, будет иметь место для тех же белковых молекул, оказавшихся изначально в области $pH > pI$. Заряженные отрицательно, они мигрируют в направлении анода и остановятся тогда, когда достигнут того же самого участка градиента ($pH = pI$).

Таким образом, выявляются сразу две существенные особенности ИЭФ, отличающие его от электрофореза: белки мигрируют с замедлением, а начальный объем препарата не влияет на конечное положение белковой зоны. Белок может первоначально занимать весь объем проводящей жидкости, например весь объем геля, или его можно внести в любой участок градиента pH , причем в любом объеме. Конечный результат будет одинаковым — все молекулы белка, имеющие одно и то же значение изоэлектрической точки, соберутся в узкую зону в том месте градиента, где $pH = pI$. Молекулы разных белков фокусируются в различные узкие зоны — так осуществляется фракционирование белковой смеси по значениям pI входящих в нее белков. Эти зоны будут оставаться очень узкими неограниченно долго,

обходимости вводить эти наполнители для предотвращения конвекции в жидкости, но не более того. Поэтому для ИЭФ используют крупнопористый ПААГ, агарозу и сефадекс. Последний, в отличие от ПААГ, должен быть достаточно мелкопористым, для того чтобы молекулы белка не проникали внутрь его гранул, а мигрировали в жидкости между ними. Размер белковых молекул, как уже упоминалось, вообще не имеет значения для их фракционирования; важно только значение pI . Рассмотрим качественно процесс фракционирования смеси белков в стационарном линейном градиенте pH электропроводящей жидкости, полагая, что характерные для всех белков значения pI лежат внутри этого градиента.

МИГРАЦИЯ БЕЛКОВ В ГРАДИЕНТЕ pH

Проанализируем для начала поведение белковых молекул, которые в некоторый момент времени находятся в таком участке градиента, где $pH < pI$, т. е. в кислой для этих белков среде. Очевидно, что они заряжены положительно и под влиянием поля должны мигрировать к катоду. До сих пор ничего не было сказано о направлении изменения pH вдоль градиента. Его создают таким образом, чтобы pH увеличивался в направлении от анода к катоду. По мере движения положительно заряженные белковые молекулы будут переходить в области градиента со все более высокими значениями pH . В силу этого их положительный заряд будет уменьшаться, а миграция — замедляться. Однако до тех пор, пока pH окружающей их среды меньше pI , движение будет продолжаться. Молекулы белка остановятся, лишь достигнув участка градиента, где для них $pH = pI$. Здесь они утрачивают заряд, так что электрическое поле на них больше не действует.

Аналогичный процесс, но происходящий в обратном направлении, будет иметь место для тех же белковых молекул, оказавшихся изначально в области $pH > pI$. Заряженные отрицательно, они мигрируют в направлении анода и остановятся тогда, когда достигнут того же самого участка градиента ($pH = pI$).

Таким образом, выявляются сразу две существенные особенности ИЭФ, отличающие его от электрофореза: белки мигрируют с замедлением, а начальный объем препарата не влияет на конечное положение белковой зоны. Белок может первоначально занимать весь объем проводящей жидкости, например весь объем геля, или его можно внести в любой участок градиента pH , причем в любом объеме. Конечный результат будет одинаковым — все молекулы белка, имеющие одно и то же значение изоэлектрической точки, соберутся в узкую зону в том месте градиента, где $pH = pI$. Молекулы разных белков фокусируются в различные узкие зоны — так осуществляется фракционирование белковой смеси по значениям pI входящих в нее белков. Эти зоны будут оставаться очень узкими неограниченно долго,

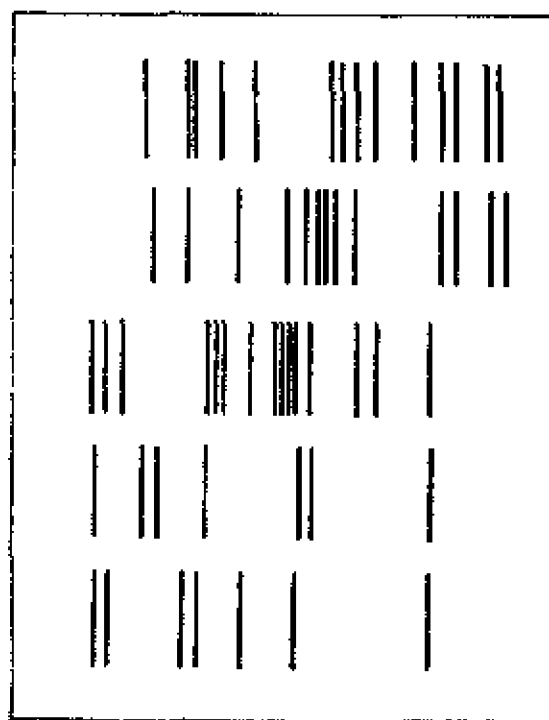


Рис. 1. ИЭФ белков скелетных мышц различных организмов [Bishop, 1979a]

1 — бык; 2 — свинья; 3 — камбала; 4 — сайд
5 — треска; градиент рН 3,5—9,5

пока сохраняется электрическое поле. Конечно, молекулы белка в результате тепловой диффузии могут случайным образом покидать зону фокусирования, но при этом они попадут в слегка более кислую или более щелочную среду, чем та, которая соответствует их полной нейтральности. Здесь они будут снова заряжаться и под действием электрического поля возвращаться обратно, в зону фокусирования.

Таким образом, ИЭФ приводит к стационарному состоянию не ограниченному временем, — это третья особенность процесса. Устанавливается некое динамическое равновесие. Полоса «сфокусированного» белка не является, разумеется, бесконечно узкой; ее ширина пропорциональна количеству содержащегося в ней белка. Но все же она оказывается гораздо более узкой, чем при электрофорезе с такой же степенью «загрузки» зоны. Чем уже полосы, тем ближе друг к другу могут быть значения pI двух разделяющихся белков. Современная техника электрофокусирования позволяет разделять в виде отдельных полос белки, у которых значения pI отличаются всего лишь на 0,01. Такая разрешающая способность — это четвертая особенность метода ИЭФ; ее иллюстрирует рис. 1 [Bishop, 1979a].

Важно подчеркнуть одно обстоятельство, которое часто недооценивается при трактовке сложных картин разделения при ИЭФ, особенно содержащих близко лежащие полосы. В процессе ИЭФ участвуют не все ионогенные группы данного белка, а только те, которые лежат на поверхности белковой глобулы и контактируют с растворителем. Только они могут диссоциировать, определяя суммарный заряд белка. В силу этого значение pI для одного и того же белка в разных конформациях может изменяться. Конформационные перестройки могут происходить в результате окисления и разрыва внутримолекулярных дисульфидных мостиков, например в ходе подготовки препарата или за счет остаточных радикалов персульфата в ПААГ. Они могут быть обусловлены действием мочевины и других диссоциирующих агентов, введенных в гель. То же происходит при частичной денатурации белка — либо тепловой (в ходе миграции через перегретые участки геля), либо под воздействием экстремальных значений рН для белков, оказавшихся исходно на краях градиента. Конформация белка может измениться в результате нарушения его связи с лигандами или образования ком

плексов с липидами, углеводами, субстратами ферментов и др. Наконец, это может произойти просто в силу присущей данному белку конформационной изомерии. Таким образом, наличие двух близко расположенных линий после ИЭФ еще не говорит о разделении двух различных по первичной структуре белков. Для такого утверждения нужна дополнительная проверка, например путем вариации условий фокусирования или предварительной обработки белковых препаратов.

Важной особенностью и достоинством метода ИЭФ является и то, что он позволяет легко определять такой важный параметр белка, как pI . Дело сводится к измерению pH в той точке градиента, где находится зона этого белка после окончания процесса ИЭФ.

АМФОЛИТЫ ДЛЯ ИЭФ

Перейдем к выяснению вопроса о том, каким образом создается градиент pH . Собственно говоря, его создает само электрическое поле. Это обусловлено особыми свойствами среды, которая выше была названа «электропроводящей жидкостью». Она представляет собой водный раствор смеси большого числа различных типов амфотерных молекул сравнительно небольшой молекулярной массы (300—900). Такого рода смеси для ИЭФ выпускаются под различными фирменными названиями: *амфолины* («LKB»), *фармалиты* («Pharmacia»), *сервалиты* («Serva») и *биолиты* («Bio-Rad»). Все они представляют собой искусственно синтезированные наборы цвиттерионов, отличающихся друг от друга внутри каждого набора значениями своих pI , более или менее равномерно перекрывающих диапазоны от 2—3 до 10—11 единиц pH . Щелочные группы в них представлены замещенными аминами, а кислые — остатками карбоксиллов (амфолины, фармалиты) или сульфокислот (сервалиты, биолиты).

Особенностью амфотерных веществ такого рода является то, что при растворении в воде каждое из них «стремится» изменить pH раствора таким образом, чтобы приблизить его к своему значению pI . При этом протоны диссоциируют от остатков кислот и присоединяются к аминогруппам. Например, при растворении в воде простейшей аминокарбоновой кислоты (глицина) устанавливается pH около 6. При этом практически для всех молекул глицина будет справедлива структурная формула $H_3N^+—CH_2—COO^-$. Стопроцентная ионизация обусловлена тем, что для карбоксила в глицине ($pK=2,34$) среда с pH 6 оказывается слишком щелочной, а для аминного конца ($pK=9,6$) — сильнокислой. Протон как бы перебрасывается с карбоксильного на аминный конец каждой молекулы, и водная среда остается почти нейтральной.

На рис. 2 кривая 1 описывает процесс титрования глицина. Почти горизонтальный участок этой кривой в интервале pH

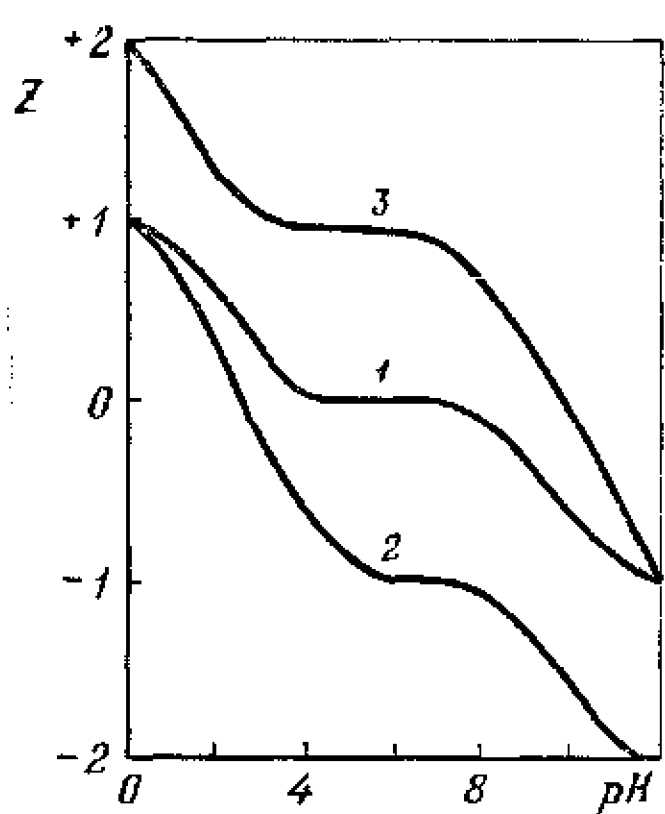


Рис. 2. Кривые титрования растворов аминокислот

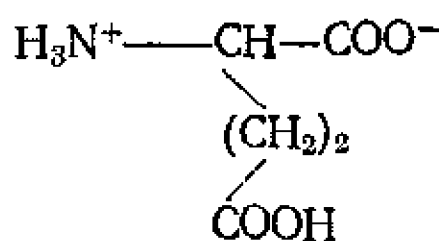
1 — глицин; 2 — глутаминовая кислота; 3 — лизин;
Z — суммарный электрический заряд молекулы

4,5—8 говорит о том, что буферная емкость раствора глицина вблизи изоэлектрической точки ($pI=5,97$) ничтожно мала. Очень малых добавок кислоты или щелочи будет достаточно для того, чтобы изменить pH раствора до значения, соответствующего одной из границ указанного интервала pH, где начинает проявляться буферный эффект.

Это происходит потому, что два значения pK для глицина сильно отличаются друг от друга («буферность» всегда проявляется при pH, близких к pK).

Для осуществления ИЭФ амфолиты не только должны задавать каждой точке градиента определенное значение pH, но и обеспечивать в этой точке буферную емкость, достаточную для того, чтобы это значение не зависело от присутствия белка в растворе. Очевидно, что глицин нельзя использовать в качестве амфолита для ИЭФ.

Иная картина получается, например, в случае глутаминовой кислоты. Две ее карбоксильные группы в α - и γ -положениях имеют соответственно $pK_1=2,19$ и $pK_2=4,25$; для аминогруппы $pK_3=9,67$. Изоэлектрическая точка глутаминовой кислоты — 3,22. При растворении этой аминокислоты в воде процесс диссоциации протонов от двух карбоксильных остатков преобладает над присоединением одного протона к аминогруппе, вследствие чего водный раствор будет закисляться до тех пор, пока pH не достигнет 3,22. При этом pH аминогруппа заведомо протонирована, а из двух карбоксилатов заряжен в большинстве случаев будет только стоящий в α -положении, для которого среда с pH 3,22 — еще достаточно щелочная. Таким образом, в растворе будет преобладать следующая структура:



Вторая карбоксильная группа остается преимущественно недиссоциированной, так как для нее pH 3,22 представляет собой кислую среду. Молекула глутаминовой кислоты оказывается в целом нейтральной за счет того, что при ее растворении в воде происходит закисление до pH 3,22. По характеру кривой 2 на рис. 2 можно заключить, что такой раствор должен обладать

хорошей буферной емкостью. Изоэлектрическая точка в этом случае вместо горизонтальной площадки лежит на крутом участке кривой титрования. При добавлении кислоты изменение pH предотвращается протонированием карбоксила в α -положении, а при добавлении щелочи — диссоциацией протона от карбоксила в γ -положении. Отметим относительную близость значений pK_1 и pK_2 , между которыми располагается изоэлектрическая точка.

Аналогичные процессы, но в щелочной области pH , протекают при растворении лизина. Для его единственного карбоксила $pK_1=2,18$, а для двух аминогрупп в α - и ϵ -положениях соответственно $pK_2=8,95$ и $pK_3=10,53$. Изоэлектрическая точка лизина — 9,74. По аналогии с изложенным легко понять, каким образом при растворении в воде лизин защелачивает ее до pH 9,74, сам при этом оказывается электрически нейтральным и, судя по кривой 3 на рис. 2, обеспечивает высокую буферную емкость. Отметим и здесь близость значений pK_2 и pK_3 , между которыми лежит pI .

Два последних примера показывают, каковы должны быть особенности структуры амфолитов, отвечающих условиям образования градиента, т. е. обладающих способностью задавать раствору нужное значение pH , при этом нейтрализуясь и обеспечивая хорошую буферную емкость раствора. По-видимому, это должны быть молекулы, несущие комбинации из нескольких, не обязательно первичных, аминов и карбоксилов (или других кислотных остатков), связанных между собой короткими углеводородными цепочками таким образом, чтобы взаимная нейтрализация зарядов при растворении сопровождалась установлением нужного pH раствора, равного pI данного амфолита. Для обеспечения хорошей буферной емкости значение pI должно лежать между двумя близко расположенными pK .

Достаточно разнообразный набор таких амфолитов был синтезирован в 1969 г. Вестербергом, что послужило основой для промышленного производства амфолинов фирмой LKB, а затем и для широкого распространения метода ИЭФ.

СОЗДАНИЕ ГРАДИЕНТА pH

Посмотрим теперь, каким образом создают градиент pH в жидкости или геле. Первоначально во всем объеме жидкости растворяют до суммарной концентрации 1—2% смесь всех амфолитов, перекрывающих выбранный интервал значений pI . Если ИЭФ предполагают вести в геле, то в этом растворе полимеризуют акриламид или агарозу, что не меняет характера описываемых ниже процессов, поскольку для миграции низкомолекулярных амфолитов сетка геля существенного сопротивления не представляет. В состав смеси входят амфолиты с различными значениями pI примерно в эквимольном соотношении. Как и в случае смеси различных буферов, их совокупное воздейст-

вие на водную среду определит некоторое среднее значение pH , одинаковое по всему объему трубки или пластины. При этом pH лишь один из амфолитов (если для него $pI = pH$) может оказаться незаряженным. Для всех остальных значений pI будут более или менее заметно отличаться от исходного pH смеси, поэтому практически все амфолиты окажутся положительно или отрицательно (слабо или сильно) заряженными. В ходе описанного ниже процесса формирования градиента заряд приобретает и тот единственный амфолит, который первоначально оказался незаряженным.

При наложении электрического поля все амфолиты начнут мигрировать в направлении анода или катода в зависимости от знака их заряда. Следует подчеркнуть, что никаких других ионов в растворе быть не должно; миграция амфолитов и составляет электрический ток в жидкости. Конечно, в переносе тока будут участвовать еще и ионы H^+ и OH^- . Но даже в тех случаях, когда используют смесь кислых или щелочных амфолитов, концентрация этих ионов будет очень мала по сравнению с концентрацией самих амфолитов.

Рассмотрим для примера миграцию амфолитов в направлении катода. Быстрее других будут двигаться амфолиты с максимальным значением pI , так как при исходном pH они несут наибольший положительный заряд. Чтобы избежать их выхода из рабочей зоны градиента и попадания на сам катод, последний помещают в слабый раствор щелочи. При подходе к щелочи положительный заряд амфолитов с наибольшим значением pI нейтрализуется, поэтому они останавливаются. Там же, вблизи катода первоначально будут находиться и амфолиты с меньшими значениями pI . Однако по мере повышения в этой зоне содержания амфолитов с максимальным pI исходная эквимоллярная пропорция будет нарушаться в пользу последних. Они будут «навязывать» раствору локальный сдвиг pH в щелочную сторону. Это ускорит уход отрицательно заряженных амфолитов с меньшим pI из катодной зоны, что приведет к дальнейшей диспропорции в пользу амфолитов с максимальным pI , дальнейшему защелачиванию раствора. Это будет происходить до тех пор, пока из прилежащей к катоду области градиента не будут вытеснены все прочие амфолиты и она не окажется занятой только молекулами амфолита с максимальным значением pI . Соответственно и pH раствора в этом месте окажется равным этому же значению. Постепенно в эту прикатодную область соберутся амфолиты с максимальным pI из всего объема жидкости; только они и смогут ее достигнуть. Для амфолитов с меньшими значениями pI катодная область градиента недоступна — в ней они приобрели бы отрицательный заряд и должны были бы под действием поля ее покинуть. По тому же механизму конкурентного вытеснения эти амфолиты расположатся в непосредственном соседстве с катодной областью, оттесняя

еще дальше амфолиты со следующим, меньшим значением pI , и т. д.

В это же время аналогичная «борьба» за место поближе к аноду будет происходить под действием поля с противоположного конца трубки или пластины. Здесь крайнее положение останутся за амфолитами с наименьшим значением pI , которые первоначально имели наибольший отрицательный заряд. От выхода к аноду их там удерживает слабый раствор кислоты.

Заметим попутно, что во избежание существенного искажения формы градиента на его концах pH катодного (католита) и анодного (анолита) электролитов не должны слишком сильно отличаться от значений pH по краям градиента.

В результате описанного процесса все амфолиты «выстраиваются» вдоль электрического поля от анода к катоду в порядке возрастания значений pI . Все они при этом нейтрализуются, «навязывают» тому объему воды, в котором они преобладают, значение pH равное их pI , и обеспечивают буферную емкость раствора в этом месте, т. е. ведут себя точно так, как им свойственно при растворении в воде в отсутствие других амфолитов.

Описанную «сортировку» амфолитов производит электрическое поле; такое положение сохраняется до тех пор, пока это поле существует. В результате диффузии и близости значений pI соседних амфолитов (из-за их многочисленности) границы между зонами сглаживаются и получается практически линейный градиент pH (рис. 3). На рисунке для сравнения изображены градиенты для трех диапазонов pH . Резкие падения и подъемы кривых на концах графиков указывают области перехода от амфолитов к электродным электролитам.

ПРОБЛЕМА ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТИ

Естественное недоумение может вызвать вопрос о поддержании электрического тока в установившемся градиенте pH . Выше упоминалось, что «расставленные по своим местам» амфолиты утрачивают заряд. Отсюда будто бы следует, что они не могут участвовать в проведении электрического тока. Но других носителей тока практически нет. Между тем, для обеспечения миграции белков вдоль градиента pH и для поддержания самого градиента необходимо наличие электрического поля, а следовательно, и электрического тока — жидкость должна оставаться электропроводящей. На практике можно наблюдать, что в процессе формирования градиента pH электропроводность раствора действительно сильно снижается, но отнюдь не до нуля. Чем же обусловлена остающаяся электропроводность?

Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо дополнить и уточнить картину состояния амфолитов в растворе при $pH = pI$. Выше было сказано, что они при этом не заряжены. Собственно говоря, именно это обстоятельство определяет изоэлек-

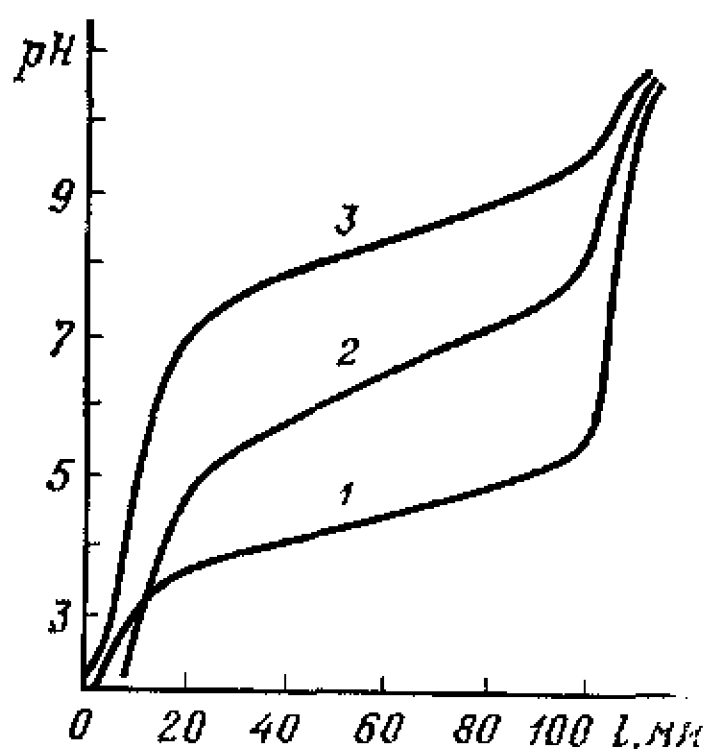
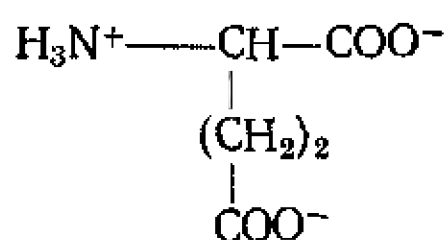


Рис. 3. Линейные градиенты pH для амфолитов трех диапазонов

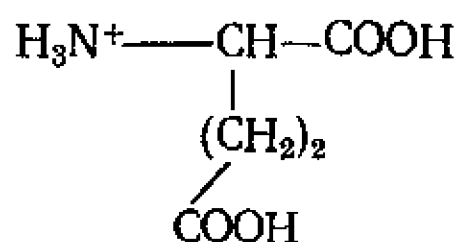
1 — pH 3—6; 2 — pH 5—8; 3 — pH 7—10; 4 — расстояние вдоль градиента

трическую точку. Тем не менее, дело обстоит не совсем так. Точнее было бы сказать, что суммарный заряд всех молекул амфолита при $\text{pH} = \text{pI}$ равен нулю, причем не только за счет молекул, действительно электрически нейтральных, которых подавляющее большинство, но и за счет некоторого (и одинакового) числа ионов того и другого знака.

Поясним их происхождение на уже рассмотренном примере раствора глутаминовой кислоты. Мы там сознательно избегали категорических утверждений. Было сказано, что в растворе при pH 3,22 преобладает изображенная там структура и что вторая карбоксильная группа остается преимущественно недиссоциированной, так как для нее раствор с pH 3,22 представляет собой кислую среду. Но ведь не очень кислую! При $\text{pH} = \text{pK}_2 = 4,25$ 50% карбоксильных групп в γ -положении было бы диссоциировано. При pH 3,22 число диссоциированных γ -карбоксилатов невелико, но все еще заметно, и часть молекул глутаминовой кислоты в растворе находится в виде отрицательных ионов:



По аналогичным причинам какая-то часть α -карбоксилатов окажется недиссоциированной, так что в растворе будут присутствовать и положительные ионы:



Разумеется, в растворе имеет место динамическое равновесие процессов ионизации и нейтрализации, в котором участвуют все молекулы глутаминовой кислоты, но статистически обеспечиваются вполне определенные соотношения между концентрациями ионов обоих знаков $[\text{Глу}^-]$ и $[\text{Глу}^+]$ и суммарной концентрацией глутаминовой кислоты $[\text{Глу}]$. Эти соотношения следуют из закона действующих масс и могут быть записаны сле-

дующим образом: $[Глу^+] = [Глу] \times 10^{pK_1 - pI}$; $[Глу^-] = [Глу] \times 10^{pI - pK_2}$.

Если сюда подставить известные значения pK_1 , pK_2 и pI для глутаминовой кислоты, то легко убедиться, что концентрации ионов обоих знаков в точности одинаковы и не очень малы — около 10% от общей концентрации глутаминовой кислоты. Но как положительные, так и отрицательные ионы могут участвовать в проведении электрического тока. Таким образом, раствор глутаминовой кислоты при $pH = pI$, будучи в целом электрически нейтральным, вполне успешно может проводить ток.

Если аналогичный расчет провести для раствора глицина, то легко убедиться, что концентрация ионов в нем и соответственно электропроводность в изоэлектрической точке очень малы. Это также обусловлено большой удаленностью значений pK_1 и pK_2 друг от друга и от лежащего между ними значения pI . В общем случае электропроводность амфолитов в изоэлектрической точке, как и их буферная емкость, оказывается тем выше, чем ближе друг к другу значения pK , между которыми располагается изоэлектрическая точка.

Описанное явление обеспечивает стационарный уровень электропроводности в любой точке установившегося градиента pH . Не следует думать, что при протекании тока градиент будет «смазываться». Ионы амфолитов, покидающие под действием поля область своего сосредоточения, попадают в соседний участок градиента с иным pH . Там они легко разряжаются, отдавая свой заряд амфолитам этого участка, и останавливаются. Мало того, при pH , отличающемся от их pI , прибывшие с током и разрядившиеся ионы склонны приобрести противоположный заряд, что их заставит вернуться в свою исходную зону.

Таким образом, возникает своеобразная эстафета с передачей зарядов ионами амфолитов, совершающих колебательные движения в окрестностях своих зон сосредоточения. Вдоль градиента pH протекает вполне заметный электрический ток, а сам градиент остается при этом неизменным.

СВОЙСТВА ПРОДАЖНЫХ АМФОЛИТОВ

Главная проблема, возникающая при синтезе амфолитов, состоит в том, чтобы обеспечить одинаковую электропроводность в любой точке градиента pH . Полностью решить ее не удастся. Амфолиты с pI , лежащими вблизи нейтральной области pH , диссоциируют все-таки хуже, чем амфолиты с кислыми или щелочными значениями pI , хотя эти различия, конечно, не столь велики, как между глицином и глутаминовой кислотой. В силу этого электропроводность в нейтральной зоне широкого градиента pH в несколько раз ниже, чем на его краях (рис. 4; [Gelsema et al., 1979]). На рисунке показаны кривые электропроводности 1%-ных растворов амфолитов трех различных марок.

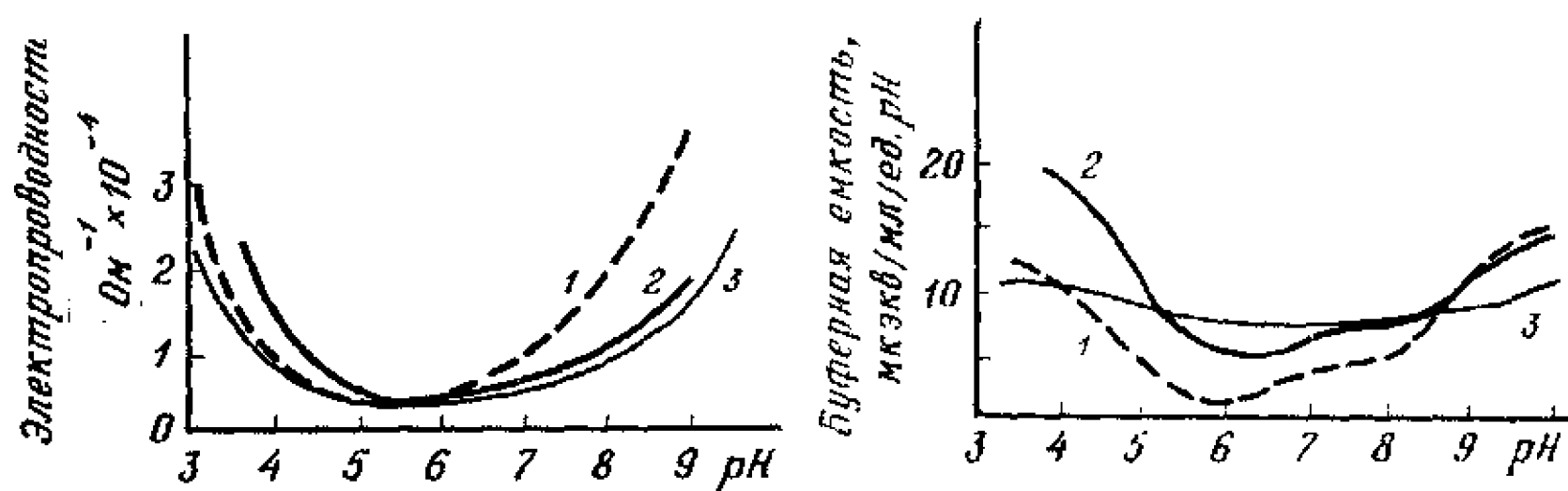


Рис. 4. Распределение электропроводностей 1%-ных растворов амфолитов вдоль градиента pH [Gelsete et al., 1979]

1 — сервалиты; 2 — амфолины; 3 — фармалиты

Рис. 5. Распределение буферных емкостей 1%-ных растворов амфолитов вдоль градиента pH [Gelsete et al., 1979]

Обозначения те же, что на рис. 3

Данные по биолитам не приведены, поскольку их промышленный выпуск начат только в 1980 г.¹

Заметно, что наиболее широким интервалом pH, в пределах которого электропроводность меняется незначительно, отличаются фармалиты. При ИЭФ, как и при электрофорезе, малая электропроводность — это преимущество амфолитов, поскольку она позволяет создавать электрическое поле повышенной напряженности без опасности перегрева геля или жидкости. Важно лишь, чтобы эта проводимость была более или менее одинаковой по длине градиента во избежание образования локальных горячих участков. Они могут возникать именно в областях пониженной проводимости вблизи нейтральных значений pH. Это легко понять, если вспомнить, что сила тока одинакова по всей длине градиента, а напряженность поля максимальна именно в этих областях.

Для полноты сопоставления трех типов фирменных амфолитов на рис. 5 приведены заимствованные из той же работы кривые изменения буферной емкости вдоль градиента pH, также для 1%-ных растворов амфолитов. Видно, что фирмам «LKB» и «Pharmacia» удалось создать амфолиты, обладающие примерно одинаковой буферной емкостью вдоль всего диапазона pH, в то время как емкость сервалитов вблизи нейтральных значений pH заметно снижается. Впрочем, следует иметь в виду, что это обстоятельство может привести к осложнениям только в случае высокой загрузки градиента белком, например при препаративном ИЭФ. В аналитическом варианте буферная емкость амфолитов редко является лимитирующим фактором.

¹ Фирма «Bio-Rad» выпускает биолиты не только для исследовательских, но и для технических целей — менее очищенные и сбалансированные в отношении обеспечения линейности градиента pH, но зато заметно более дешевые.

Заметим попутно, что значения буферной емкости по оси ординат на рис. 5 выражены количеством микроэквивалентов сильной кислоты или щелочи, которое при внесении в 1 мл соответствующего раствора амфолитов может изменить его рН на единицу. Эти значения здесь соответствуют состоянию установившегося градиента рН, когда емкости амфолитов минимальны. Буферная емкость в 0,35 ммоль/мл для изменения рН на единицу, указываемая для фармалитов в проспектах фирмы «Pharmacia», явно относится к их исходной смеси, поэтому полезной информации не содержит и носит рекламный характер.

ОПАСНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ СЛОЯ ЧИСТОЙ ВОДЫ

Желательно, чтобы амфолиты были равномерно распределены по всему градиенту рН. Особенно это важно в области нейтральных значений рН во избежание образования там слоя чистой воды. Если такой слой возникает, то в силу его малой электропроводности произойдут сильный разогрев и искажение соседних участков градиента рН за счет усиленной диффузии. Кроме того, в слое чистой воды сконцентрируется практически все напряжение источника тока, так что фокусирующий эффект градиента в целом окажется очень малым.

Описанная ситуация особенно легко может возникнуть при использовании смесей амфолитов, обеспечивающих рабочий градиент рН целиком в кислой или щелочной областях, т. е. не перекрывающий нейтральных значений рН. В этих случаях на границе градиента, в зоне перехода от амфолитов к катоду или аноду, рН неизбежно должно пройти через значение 7, так что может образоваться слой чистой воды. Ввиду этого при составлении кислой или щелочной рабочей смеси амфолитов нередко добавляют в небольшой концентрации еще и амфолиты для нейтральной области рН (6—8). Они заполняют участок перехода от рабочего градиента к одному из электролитов. При этом каким-то участком рабочего объема приходится пожертвовать, но если концентрация нейтральной смеси амфолитов невелика, то и участок этот будет небольшим. В последние годы сами фирмы-производители из предосторожности стали добавлять в смеси амфолитов для кислых и щелочных диапазонов рН необходимые количества нейтральных амфолитов, не указывая этого в маркировке смеси. Тем не менее, опасности появления слоя чистой воды не следует упускать из виду, особенно если путем электрофокусирования отбирают амфолиты для более узкого, чем продажный, диапазона значений рН (см. ниже).

РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ. ВЫБОР ДИАПАЗОНА рН

Высокая разрешающая способность метода ИЭФ уже упоминалась выше. Независимо от способа подавления конвекции в жидкости (гель, сефадекс, сахароза), эту способность можно

количественно охарактеризовать как минимальное различие pI двух белков, которое еще обеспечивает четкое разделение соответствующих зон (полос). Исходя из общих соображений можно ожидать, что разделение будет лучше в случае крупных белков ввиду уменьшения расширения полос за счет диффузии. Кроме того, разделению двух близких по значениям pI белков должно способствовать повышение напряженности электрического поля и уменьшение крутизны градиента pH . Чем более пологий градиент, т. е. чем меньше интервал изменения pH , перекрывающий всю длину трубки или пластины, тем дальше будут отстоять друг от друга полосы белков, незначительно отличающихся по величине pI , тем лучше «разрешение». Впрочем, не следует забывать, что за это приходится «расплачиваться» увеличением длительности процесса ИЭФ. При пологом градиенте pH белки заряжены слабее и движутся к положению равновесия медленнее. Правильность этих предположений подтверждают как строгая теория ИЭФ, так и практика.

Наряду со смесью амфолитов, обеспечивающей формирование градиента pH на весь биохимически интересный диапазон (pH 2,5—10), с целью более тонкого разделения белковых полос фирмы выпускают и смеси амфолитов для относительно узких (шириной в 1,5—3 единицы), перекрывающихся между собой интервалов pH (2,5—4; 3,5—5; 4—6; 5—8 и т. д.). Смеси сервалитов в интервале pH 4—5,5 выпускаются даже для долей этого интервала шириной всего в 0,5 ед. pH . Следует иметь в виду, что эти интервалы указываются для ИЭФ в градиенте сахарозы. При использовании амфолитов для ИЭФ в геле какая-то доля щелочного участка указанного в маркировке интервала pH за счет эндосмоса неизбежно уходит из геля к катоду, поэтому следует готовить и использовать смеси продажных амфолитов, как это будет рекомендовано ниже.

Амфолиты, обеспечивающие широкий интервал pH , удобны для исследования сложных смесей белков с неизвестными значениями pI , тогда как амфолиты с узким интервалом — для тонкого фракционирования белков с близкими и приблизительно известными значениями pI . Амфолиты выпускаются в продажу в виде концентрированных 30- или 40%-ных стерильных водных растворов, а наиболее кислые или щелочные смеси ввиду их повышенной электропроводности — чаще в виде 20%-ных растворов. При составлении рабочих градиентов pH их разбавляют до оптимальной концентрации (1—2%).

В некоторых случаях особо тонкого фракционирования градиент с интервалом в 2 ед. pH может оказаться еще слишком «крутым». Продажную смесь с таким интервалом можно в лабораторных условиях разделить на смеси с интервалом в 0,5 ед. pH . Для этого достаточно провести электрофокусирование смеси амфолитов и после установления градиента pH физически отобрать ту его часть, на которую приходится нужный узкий интервал. Это удобно делать в колонках, где градиент pH соз-

дается в жидкости без носителя. Такие колонки описаны в гл. 4. Отобранную часть градиента используют для нового ИЭФ. Если при этом раствор амфолитов придется разбавлять, например для проведения фракционирования в той же колонке или геле большого размера, то исходную концентрацию амфолитов нужно взять в соответствующее число раз более высокой. При этом и можно потерять внесенную фирмой добавку нейтральных амфолитов. Перед использованием отобранного узкого диапазона рН эту потерю необходимо восполнить.

В некоторых случаях линейный характер градиента рН не является оптимальным — например, когда в одном опыте желательно отделить все не интересующие исследователя белки, не заботясь об их фракционировании, но одновременно провести тонкое разделение белков, лежащих в определенном узком диапазоне рН. Для этой цели удобен градиент с «площадкой» (рис. 6). Из рисунка видно, что в интервале рН 7—8 градиент пологий — растянут на большую часть длины геля или колонки. Такую форму градиента нетрудно получить, если к раствору с умеренной (0,5—1%) концентрацией амфолитов широкого диапазона рН добавить в такой же или большей концентрации амфолиты для интересующего интервала рН. Благодаря своей повышенной (суммарной) концентрации амфолиты добавленного интервала оттеснят другие амфолиты к краям градиента, куда в процессе ИЭФ отойдут и ненужные белки. В то же время для представляющих интерес белков будут созданы условия тонкого фракционирования в пологом градиенте рН. Отметим попутно, что и сами белковые полосы в пологих градиентах рН оказываются шире, что практически не очень мешает их разделению, но позволяет увеличить загрузку градиента белком.

Аналогичный простой и дешевый способ улучшения разделения белков с близкими значениями pI (изоферментов) был предложен Касперсом и др. [Caspers et al., 1977]. Вместе с амфолитами в гель вносили в довольно высокой концентрации (1—4%) природные или не природные аминокислоты, выбирая их таким образом, чтобы pI аминокислоты была близка к pI фракционируемых белков. Эти аминокислоты и создавали пологий участок градиента в области фокусирования нужных белков.

Упомянем также возможность использования при ИЭФ в аналитических целях аффинных взаимодействий, например бел-

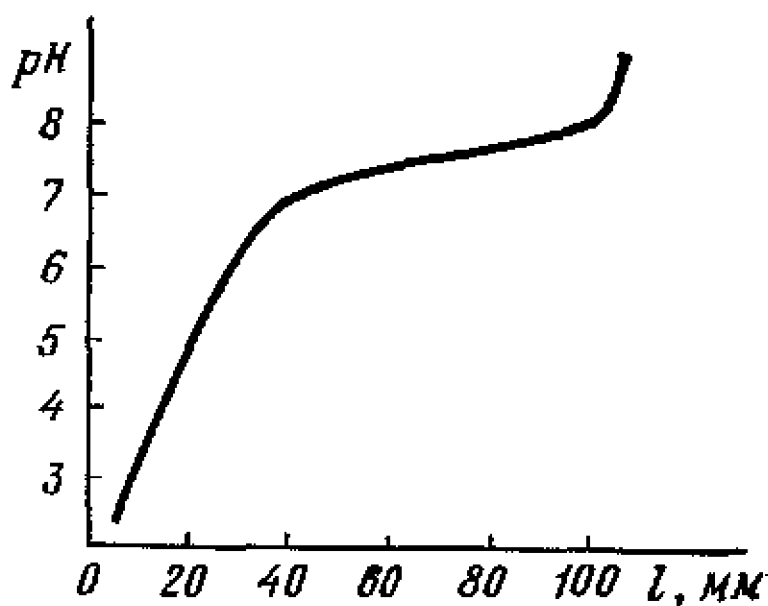


Рис. 6. Нелинейный градиент рН (с «площадкой»)

l — расстояние вдоль градиента

ков с лигандами. Последние могут быть заполимеризованы или механически задержаны в геле. Обладающие сродством к лиганду белки в этом случае не покидают зоны внесения препарата, что проявляется в отсутствии соответствующих полос при сравнении с картиной ИЭФ в контрольном геле [Horejši, Tichá 1981].

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АМФОЛИТОВ

Некоторые физико-химические особенности современных амфолитов для ИЭФ не позволяют пока считать их вполне совершенными в отношении функций, которые они выполняют. Желательно, например, чтобы амфолиты максимально отличались от белков по способу окраски, легкости отделения и др. Подробно изучены в этом плане амфолины фирмы «LKB». Оказалось, что они окрашиваются нингидрином и многими красителями для белков; правда, ниже приведены рецепты красителей, позволяющих в значительной степени обойти это затруднение. Молекулярная масса амфолинов ограничена, как указывалось, в основном интервалом в 300—900 дальтон, что позволяет отделить их от сфокусированных белков после опорожнения колонки или элюции из геля с помощью гель-фильтрации, диализа или высаливания. Однако, хотя и в небольшом количестве, среди амфолинов имеются молекулы с массой 20—30 тыс.

Ультрафиолетовое поглощение амфолинов вблизи 280 нм не велико, но не равно нулю, особенно в интервалах pH 9—11 и 3,5—5. Амфолины последнего интервала обладают хорошо выраженным максимумом поглощения вблизи 310 нм.

За счет присоединения к двум соседним азотным группировкам амфолины способны хелировать металлы. При этом наибольшей активностью отличаются амфолины интервала pH 8,5—10. Это обстоятельство может неблагоприятно сказываться на биологической активности некоторых металлопротеидов. По сравнению с ЭДТА хелирующая способность амфолинов для большинства металлов невелика. Исключением служит двухвалентная медь — для нее амфолины выступают в роли столь же эффективных хелирующих соединений, как ЭДТА, поэтому медьсодержащие белки легко могут ими инактивироваться. Для уменьшения этой опасности такие белки следует вносить в гел для ИЭФ после установления градиента pH со стороны кислого его конца. К счастью, инактивация ферментов вследствие утраты ионов металла редко бывает необратимой.

Токсичностью по отношению к белкам амфолины не обладают. По-видимому, никаких комплексов с белками они не образуют.

ЭНДОСМОС

Это явление характерно для всех процессов фракционирования молекул в гелях под действием электрического поля, в том числе и для ИЭФ. Суть его заключается в том, что с неподвижной матрицей геля всегда связано некоторое количество заряженных (чаще всего отрицательно — остатки кислот) ионогенных групп. Их соответствующие противоионы (катионы) находятся в растворе. Под действием электрического поля они мигрируют к катоду, понемногу увлекая за собой и жидкость, находящуюся внутри геля. На смену им приходят катионы из анодного электролита. Вместе с жидкостью в направлении катода «дрейфует» и весь градиент pH , постепенно выходя из объема трубки или пластины. Ввиду длительности процессов ИЭФ этот «катодный дрейф» может существенно сместить картину распределения белков, а некоторые ближайшие к катоду полосы могут быть и вовсе утрачены. Кроме того, наиболее крупные, медленно мигрирующие молекулы белков могут не успевать следовать за смещением градиента, так что их полосы будут размазываться. Явление эндосмоса сильнее выражено в щелочной области pH , где в полной мере проявляют себя связанные с матрицей отрицательные заряды.

Заметим еще, что для ИЭФ, особенно после установления градиента pH и соответственного снижения электропроводности, характерны более высокие значения напряженности электрического поля, чем для электрофореза. Между тем, явления эндосмоса выражены тем сильнее, чем выше напряженность поля. Следует также иметь в виду, что эта напряженность вследствие различия электропроводности разных амфолитов (см. выше) оказывается неодинаковой в разных участках градиента. Отсюда следует, что и течение жидкости в результате эндосмоса будет неравномерным вдоль градиента. Из областей повышенной напряженности поля жидкость будет вытекать быстрее, чем поступать в них из соседних областей, где напряженность поля ниже и эндосмос выражен слабее. Это может привести к обсыханию некоторых областей геля и переполнению других. Обсыхание влечет за собой дальнейшее увеличение сопротивления, напряженности поля и эндосмоса. В конечном счете могут развиваться существенные искажения градиента pH .

Ввиду изложенного, забота о снижении эндосмоса — важный момент проведения ИЭФ белков. В первую очередь, это накладывает определенные ограничения на используемые для образования гелей материалы, как это более подробно рассмотрено ниже.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ИЭФ

ИЭФ в ГОРИЗОНТАЛЬНЫХ ПЛАСТИНАХ ПААГ

Преимущества использования для ИЭФ тонких горизонтальных пластин геля столь очевидны, что достаточно их перечислить без всяких комментариев. Вот важнейшие из них.

1. Препарат можно вносить в любое место открытой поверхности геля.

2. Можно одновременно вести ИЭФ многих препаратов в идентичных условиях.

3. Лабильные белки можно вносить в любой участок градиента рН уже после его формирования.

4. Интенсивный и равномерный теплоотвод.

5. Можно измерять рН и напряженность поля непосредственно на поверхности геля.

6. Удобство фиксации, окраски, фотографирования и авто-радиографии материала в геле.

Для ИЭФ в этом случае используют те же приборы, что и для электрофореза в горизонтальных гелях — «Мультифор» (LKB-2117) и другие аналогичные конструкции («Desaphor», «Bio-Rad 1415», «Pharmacia FBE-3000» и др.). Аналитическое фокусирование обычно ведут в направлении меньшего размера охлаждающего столика на длине 10—12 см одновременно для многих препаратов. В случае полупрепаративного ИЭФ с его большей загрузкой и относительно широкими полосами разделение белков проводят в направлении бóльшего размера столика на длине 26 и даже 40 см.

В отличие от электрофореза объемы электродных буферов (электролитов) при ИЭФ желательно свести до минимума. С одной стороны, опасность изменения рН электролитов в результате электролиза из-за небольшой силы тока невелика. С другой стороны, возникновение конвекционных токов жидкости в объемах электродных резервуаров может вызвать нарушение установившихся градиентов рН между электродами и гелем. Поэтому при ИЭФ в горизонтальных гелях объем электродного «резервуара» сводится к объему жидкости, смачивающей одну или несколько полосок фильтровальной бумаги. Эти полоски накладывают прямо на поверхность геля, и к ним прижимают по всей длине платиновую проволоку или угольный электрод.

ПААГ для ИЭФ

Приготовление смеси мономеров акриламида производят точно так же, как для электрофореза. Те же соображения и рекомендации остаются в силе для подбора концентраций иницирующих добавок — персульфата аммония или рибофлавина.

Вносить в смесь ТЕМЭД нет необходимости, так как амфолиты сами играют роль катализаторов полимеризации.

Следует избегать внесения избытка персульфата аммония. Он может окислять амфолиты, а также вносить искажения в градиент рН. Особенно сильные искажения могут наблюдаться вблизи анодного конца градиента, где концентрируются отрицательные ионы персульфата. Как и при электрофорезе, остающиеся в геле стабильные свободные радикалы персульфата способны окислять белки. В тех случаях, когда угроза окисления белков представляется серьезной, следует провести предварительное фокусирование амфолитов в геле без препарата в течение 2—3 ч. За это время отрицательно заряженные радикалы успеют покинуть гель и уйти к аноду. Однако часть радикалов персульфата останется в геле из-за существования их незаряженной формы. Для их нейтрализации можно до внесения белкового препарата «прогнать» через весь градиент рН от его катодного к анодному концу тиогликолевую кислоту в количестве, эквивалентном внесенному персульфату, как это иногда делают и перед электрофорезом. Нередко вместо этого прямо в гель перед его полимеризацией добавляют дитиотреитол до концентрации 1 мМ.

При замене персульфата на рибофлавин следует иметь в виду, что такая замена возможна только для первоначального значения рН смеси амфолитов ниже 7,5. В щелочной области рН рибофлавин в качестве инициатора полимеризации неэффективен.

Уже упоминалось, что ИЭФ удобно вести в крупнопористом ПААГ, например 5%-ном ($T=5$; $C=3$). Для его полимеризации достаточно ввести персульфат аммония в концентрации 0,025%. Особенно высокие требования при ИЭФ приходится предъявлять к чистоте акриламида. Важно уменьшить содержание в нем акриловой кислоты, приводящей к возникновению эндосмоса. Если нет уверенности в чистоте продажного препарата, его следует перекристаллизовать или лучше обработать уже в виде маточного раствора смеси мономеров 1—2%-ной суспензией бифункциональной ионообменной смолы типа «Amberlite MB-1» или «AG501×8».

Для подавления остаточных явлений эндосмоса имеет смысл увеличить вязкость жидкой среды в геле, введя в нее до 10% глицерина. Иногда для этой цели используют сахарозу или сорбит, но глицерин, как правило, чище; к тому же его можно легко перегнать. Увеличение вязкости не слишком сильно замедляет электрофоретическую миграцию белков, но очень существенно уменьшает степень увлечения жидкой среды движущимися к катоду противоионами, т. е. степень катодного дрейфа градиента рН.

Выбирая амфолиты для смеси, следует иметь в виду не только желательный градиент значений рН, но и переходы от него к электродам, с тем чтобы не допускать образования слоя чис-

той воды и смягчить резкие скачки рН от амфолитов к кислоте или щелочи. Об образовании слоя воды и мерах предупреждения этого явления было сказано выше. Резкие переходы рН от рабочего градиента к электролитам электродов приводят к закислению или защелачиванию заметного участка на соответствующем конце градиента и к оттеснению амфолитов внутрь рабочего объема геля.

Во избежание этого для образования градиента, например в области рН 2,5—4,2, фирма «LKB» рекомендует смешать амфолины диапазонов рН 2,5—4, 3,5—5 и 4—6 в пропорции 6:3:1 так, чтобы суммарный их объем составил $\frac{1}{20}$ полного объема геля. Указанное соотношение основной и вспомогательных смесей амфолинов фирма рекомендует и в других случаях. Для большинства смесей при этом получается 2%-ная конечная концентрация амфолинов в растворе, поскольку они поставляются в виде 40%-ных растворов. Для смесей с участием амфолинов для диапазонов рН 2,5—4 и рН 9—11 конечная концентрация будет ниже, так как эти амфолины ввиду их повышенной электропроводности выпускаются в виде 20%-ных растворов.

Однако концентрацию амфолитов нельзя снижать слишком сильно. Во всяком случае, она должна быть больше 1%, иначе возникнут локальные участки разогрева геля. По-видимому, это происходит из-за недостаточного перекрывания соседних зон амфолитов между собой. Кроме того, при недостаточной концентрации амфолитов градиент оказывается нелинейным, а это приводит к заметному сдвигу картины распределения белковых полос.

В качестве катодного электролита для градиента, лежащего целиком в кислой области рН, лучше использовать не щелочь, а 2%-ный раствор амфолинов диапазона рН 6—8. Анодным электролитом может служить 1 М раствор H_3PO_4 . Для градиента в щелочной области рН (7,8—10) та же фирма рекомендует смесь амфолинов диапазонов рН 7—9 и рН 9—11 в пропорции 1:4. В этом случае 2%-ный раствор амфолинов рН 6—8 рекомендуется использовать в качестве анодного электролита, а катод следует поместить в 1 М NaOH . Диапазон рН 4,5—7 можно обеспечить, смешав 2%-ные растворы амфолинов рН 5—7 и рН 7—9 в соотношении 3:1; при этом в качестве электродных электролитов следует использовать 1 М NaOH и 1 М H_3PO_4 . Такие же электролиты используют при работе с широким диапазоном рН (3,5—10).

Можно заметить, что во всех трех рассмотренных примерах фирма «LKB» рекомендует использовать смеси амфолинов, входящие по своему составу за пределы желаемого диапазона рН, причем именно в сторону щелочных его значений. Это связано с эндосмосом, который полностью подавить не удастся. Наиболее щелочная область смеси амфолинов, как уже упоминалось, в ходе ИЭФ покинет гель и уйдет к катоду.

Напомним, что смеси амфолитов для разных интервалов рН можно комбинировать для улучшения линейности градиента или, наоборот, для введения в него пологого участка с целью более тонкого фракционирования части белков смеси. Общее правило здесь таково: увеличение относительного содержания амфолитов определенного узкого диапазона рН приводит к расширению занимаемой ими области на градиенте и, следовательно, к более пологому ходу его на этом участке.

Можно также обратить внимание на довольно высокие значения концентрации кислоты и щелочи, используемых в качестве электролитов. Они диктуются незначительностью их объемов (жидкость, смачивающая полосы фильтровальной бумаги, подложенные под электроды по краям геля). Опасности денатурации белков это не создает из-за возможности нанесения исходного препарата на горизонтальную пластину в достаточном удалении от электрода (другая ситуация складывается при ИЭФ в трубках). Вместе с тем, имеется опасность захвата щелочью углекислого газа из воздуха, образования угольной кислоты и проникновения ее под действием поля в гель. В результате в нем могут возникнуть микропузыри, нарушающие однородность электрического поля. Во избежание этого фирма «Bio-Rad» рекомендует к 1 М NaOH добавлять до 0,02 М Ca(OH)₂.

Вообще опасность закисления щелочных участков, в том числе и самого градиента рН, при горизонтальном ИЭФ в открытых пластинах нельзя недооценивать. Такое закисление может приводить к заметным изменениям рН в геле и даже к выходу сильнощелочных белков из геля в катодный электролит [Delincée, Radola, 1978]. Для устранения этой опасности желательно проводить ИЭФ в атмосфере азота или хотя бы помещать в электродный резервуар прибора (пустующий при ИЭФ) стаканчик с крепким раствором щелочи, а крышку прибора герметизировать липкой лентой.

Прочитируем еще некоторые интересные рекомендации фирмы «Pharmacia» в отношении электродных растворов при использовании фармалитов. Для случаев, когда кислая граница градиента лежит в районе рН 3, фирма рекомендует в качестве анолита использовать 0,04 М раствор аспарагиновой кислоты, для рН 4—5 — такой же раствор глутаминовой кислоты, а для рН 6—8 — 0,25 М раствор продажного буфера HEPES.

Если прилегающая к катоду граница градиента лежит в области рН 5—6,5, в качестве католита фирма рекомендует 0,2 М раствор гистидина, а для более щелочных градиентов — 0,1—0,2 М раствор лизина или наконец, 1 М NaOH.

Для приготовления гелей удобно пользоваться 30%-ным маточным раствором смеси мономеров (29,1 г акриламида и 0,9 г метиленбисакриламида, вода до 100 мл), 10 мл которого достаточно для приготовления смеси с конечным объемом 60 мл. Туда же можно добавить 7 мл 87%-ного глицерина и 3 мл смеси концентрированных амфолитов в выбранной для данного

опыта пропорции. Разумеется, в отличие от гелей для электрофореза, никакого буфера здесь не нужно; остается добавить лишь персульфат аммония (после деаэрации смеси). Маточный раствор смеси мономеров следует профильтровать через мембранный фильтр с порами диаметром 1,2 мкм и хранить при 4° не более недели. При этом сосуд с раствором желательно обернуть фольгой, так как даже темное стекло недостаточно защищает его от света, под действием которого акриламид постепенно разлагается, давая в качестве одного из продуктов акриловую кислоту.

Использование мочевины и детергентов

Из-за снижения растворимости белков вблизи изоэлектрической точки и опасности их осаждения иногда в состав геля для ИЭФ приходится вводить мочевину. Для плохо растворимых и склонных к агрегации белков это может быть необходимым с самого начала, еще на стадии приготовления препаратов. Многие гидрофобные белки для своего растворения нуждаются в добавлении детергентов, например неионных — типа Тритона X-100 или Nonidet P-40 (NP-40). Наконец, нередко случаи, когда надежное растворение белков удается обеспечить только совместным воздействием мочевины и детергентов.

Мочевину можно использовать в высокой концентрации (вплоть до 9 М). Она должна быть надежно очищена и деионизована с помощью бифункциональной ионообменной смолы. Неионные детергенты вводят в концентрации 1—3%. Будучи незаряженными, все эти добавки в первом приближении не сказываются на процессе образования градиента рН. Результирующая картина ИЭФ смеси белков при этом нередко заметно упрощается за счет исключения конфигурационной изомерии, приводящей к различной степени экранирования ионогенных групп белков и расщеплению их зон при фокусировании (см. выше). Чувствительность метода соответственно повышается.

Так, проводя ИЭФ в присутствии 9 М мочевины и 2%-ного раствора NP-40, Цехель надежно разделял α -субъединицы РНК-полимеразы из нормальных и зараженных фагом бактерий *E. coli* (отличие сводится к присоединению одного остатка АДФ-рибозы), а также из диких и мутантных штаммов бактерий (замена одного аминокислотного остатка) [Zechel, 1977]. Кстати, на последнем примере можно оценить чувствительность метода ИЭФ: отличие в одну заряженную группу (замена лейцина гистидином) в белке с молекулярной массой 40 000 оказывается достаточным для разделения белковых полос. Впрочем, иногда разница между двумя белками может сводиться только к различию конфигураций (степени экранированности зарядов); тем не менее, при ИЭФ происходит разделение белков. По-видимому, именно этим можно объяснить наблюдавшееся тем же автором расщепление полосы актина после его обработ-

ки N-этилмалеинимидом — ведь изменения заряда при такой обработке не происходит.

Однако, связываясь с белком, детергент не только улучшает его растворимость, но и может вызывать артефакты дополнительного расщепления полос за счет маскирования каких-либо заряженных групп на поверхности белка или воздействия на характер их диссоциации. Такое явление недавно наблюдали Ригетти и соавторы при фракционировании α -, β - и γ -глобинов.

Лиофилизированные суммарные препараты растворяли в 8 М растворе мочевины, содержавшем 3% NP-40 и 10% β -меркаптоэтанола. ИЭФ проводили в горизонтальной пластине 6%-ного ПААГ на приборе Мультифор в смеси, содержащей 2% амфолинов pH 6—8 и 0,2% амфолинов pH 3,5—10. При полимеризации геля в одном случае добавляли в него до 8 М мочевины, а во втором — еще и NP-40 до концентрации 3%. Во втором варианте разделение полос α -, β - и γ -глобинов улучшалось, но сами эти полосы расщеплялись [Righetti et al., 1979].

Отметим также, что NP-40 образует комплексы с самими амфолинами, которые выпадают в осадок при фиксации белков ТХУ. Гель при этом мутнеет; его надо длительное время отмывать 10%-ным раствором ТХУ в 30%-ном этаноле до полной прозрачности и лишь затем окрашивать в нем белки.

Растворения некоторых мембранных белков в неденатурированном состоянии удается добиться только с помощью высоких (до 10%) концентраций Тритона X-100. При фокусировании его же вносят в состав геля. Банга и соавторы указывают на то, что для успешного фокусирования в этом случае необходимо принимать особые меры по деионизации всех жидкостей, начиная от самой суспензии мембран и маточного раствора детергента и кончая смесью мономеров геля перед его полимеризацией [Banga et al., 1978].

Для растворения некоторых мембранных белков упомянутых средств оказывается недостаточно. Ионные детергенты типа ДДС-На или цетавлона непригодны — электрическое поле уведет их из геля. В этих случаях может помочь использование цвиттерионных детергентов, выпускаемых фирмой «Calbiochem» под общим названием «Zwittergent». Описано, например, растворение цитохрома Р-450 из эндоплазматического ретикулума печени мыши с помощью 1%-ного раствора Тритона X-100, содержащего 1% Zwittergent 3-14 (это цвиттерион вида $(\text{CH}_3)_2 \cdot (\text{C}_{14}\text{H}_{29})\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$; в цитируемой работе он обозначен SB₁₄). В состав ПААГ для фокусирования в диапазоне pH 7—11 тоже вносили по 0,05% обоих детергентов. Меньшая их концентрация в геле или использование только одного из них не обеспечивают сохранения белка в растворе. Есть предположение, что Тритон X-100 и Zwittergent 3-14 образуют смешанные мицеллы особой формы, обуславливающей их повышенное со-

любимизирующее действие [Hielmeland et al., 1979]. Отметим, что при ИЭФ белков, особенно склонных к окислению, в гель можно ввести 1 мМ дитиотреитола.

Подготовка пластин и прибора

Подготовка и сборка формы для пластины геля, деаэрация смеси мономеров акриламида и амфолитов, добавление персульфата аммония, заливка в форму, полимеризация и извлечение геля из формы — все эти операции производят точно так же, как при электрофорезе в горизонтальных пластинах ПААГ, за исключением того, что из-за высокой вязкости раствора, содержащего глицерин, деаэрацию следует вести дольше — около 10 мин. Необходимо напомнить, что мономеры акриламида очень токсичны, поэтому надо избегать их попадания на кожу и в дыхательные пути.

Стандартная форма фирмы «LKB» предназначена для получения пластин ПААГ размером 10×25 см и толщиной 2 мм. Ее резиновую прокладку слегка смазывают силиконовой смазкой. Готовый для помещения в прибор гель располагается на тонкой стеклянной пластине. В таком виде его устанавливают на охлаждающий столик прибора Мультифор. Перед работой полезно дать гелю «состариться» (завершить полимеризацию в течение ночи на холоду), обернув его полиэтиленовой пленкой во избежание обсыхания. Гели со щелочными амфолитами хранить дольше не следует — они не очень устойчивы. Нейтральные и кислые гели можно хранить во влажной камере и на холоду в течение нескольких дней.

Для приготовления гелей толщиной 0,8 и 1,6 мм фирма «Bio-Rad» предлагает новый простой способ, основанный на использовании капиллярных сил. Стеклянную пластинку через боковые прокладки накладывают на горизонтально расположенную подложку из полиакрилата. Смесь мономеров и амфолитов из пипетки вносят в зазор между пластинкой и подложкой. Капиллярные силы втягивают жидкость до тех пор, пока она не заполнит весь свободный объем под пластинкой. Уплотнений при этом не требуется. По окончании полимеризации гель легко отрывается от подложки — его можно поднять вместе со стеклянной пластинкой. Дело здесь в полиакрилате — он хорошо смачивается, но застывший гель к нему не прилипает.

Описано также ИЭФ в ультратонких гелях (0,12 и 0,24 мм). Полимеризацию ведут в стеклянной форме с прокладками из одного или двух слоев парафильма. Одно из стекол формы покрывают смоченным целлофаном, на котором гель впоследствии переносят на столик прибора Мультифор (для улучшения теплоотвода), а затем и в ванночку для окрашивания. Заливают форму заранее рассчитанным объемом смеси мономеров через тонкую иглу шприца, слегка раздвинув пластинки формы сверху. После заливки их снова сжимают и жидкость заполняет

весь объем формы. Благодаря эффективному охлаждению тонкой пластины геля имеется возможность проводить ИЭФ при высокой напряженности электрического поля, что позволяет получить узкие полосы белка [Görg et al., 1978].

Преимущества ультратонких ПААГ для ИЭФ столь существенны, что в разработку методов их приготовления включаются и ведущие фирмы. «Pharmacia» предлагает метод, основанный на применении выпускаемого фирмой реактива Silane A174 (γ -метакрилоксипропилтриметоксисилана). Обработка стекла этим реактивом присоединяет активные винильные группы к его поверхности. ПААГ, полимеризованный на таком стекле, связывается с ним прочной химической связью. Обработка реактивом проста — достаточно вымачивать хорошо очищенное стекло в течение часа в 0,4%-ном свежеприготовленном водном растворе Silane A174, подкисленном до pH 3,5 уксусной кислотой. Для приготовления ультратонкого геля по краям вдоль больших сторон обычного стекла размером 230×115 мм наклеивают одну или несколько полосок водоотталкивающей липкой ленты толщиной 0,05 мм. Этим задается толщина будущей пластины геля. Смесь мономеров акриламида вносят между полосками с одного узкого края стекла. Затем, начиная с этого же края, осторожно накладывают вторую стеклянную пластину такого же размера, обработанную Silane A174 (следить за отсутствием воздушных пузырей!). Слегка сжимают стекло зажимами; герметизация не нужна. После окончания полимеризации верхнюю пластину с прочно приставшим к ней ровным ультратонким слоем ПААГ можно просто поднять.

Фирма «LKB» выпускает для ИЭФ в приборе Мультифор уже готовые пластины ПААГ того же размера (но толщиной 1 мм) под названием «LKB 1804 Ampholine PAG plate» на следующие диапазоны pH: 3,5—9,5; 4—5; 4—6,5 и 5,5—8,5. Пластины представляют собой 5%-ный ПААГ, сшитый 0,15% бисакриламида и содержащий по 2,4% амфолинов соответствующего диапазона. Гель сформирован на прозрачном пластике толщиной менее 0,1 мм, что существенно улучшает условия теплоотвода во время ИЭФ. Каждая пластина герметически запечатана в прозрачную пленку. Перед началом опыта упаковку обрезают по краям, кладут пластину на столик прибора и снимают защитную пленку. После этого пластинка готова к наложению на нее электродов и внесению препаратов. В случае необходимости фокусирования малого числа препаратов часть пластинки можно просто отрезать ножницами и сохранить.

Фирма «Serva» продает готовые пластины для диапазонов pH 3—10, 4—5 и 7—8 под общим названием «Servalylt precotes». 5%-ный ПААГ в них содержит соответствующую смесь амфолинов в суммарной концентрации 3% с добавлением до 10% сорбита. Кроме того, эта же фирма предлагает полиэфирные пленки толщиной 0,18 мм для полимеризации на них акриламидного геля или агарозы («Gel-Fix sheets»). Пленки, предназ-

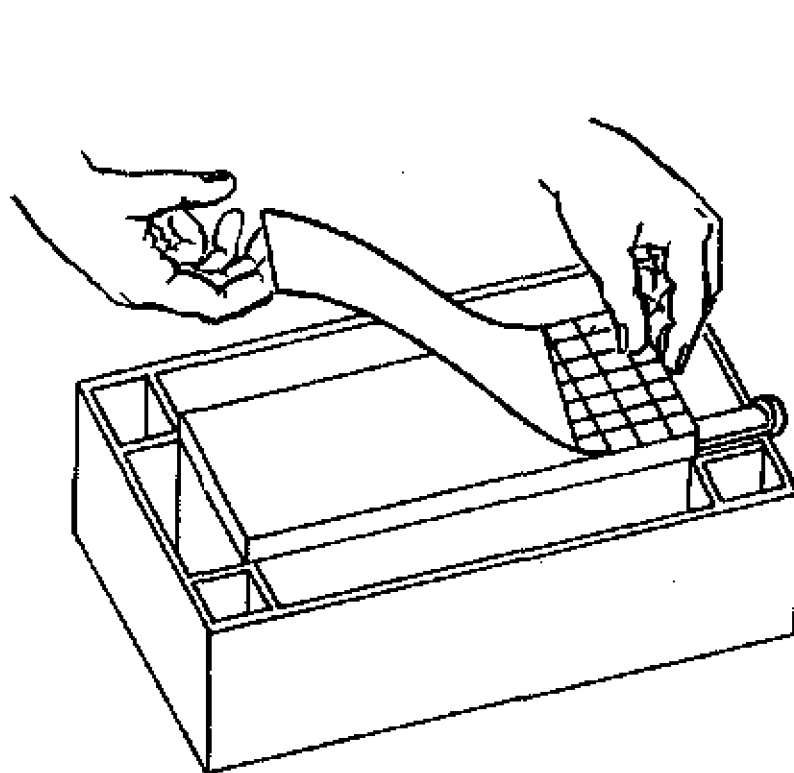


Рис. 7. Укладка трафарета с сеткой на охлаждающий столик прибора «Мультифор»

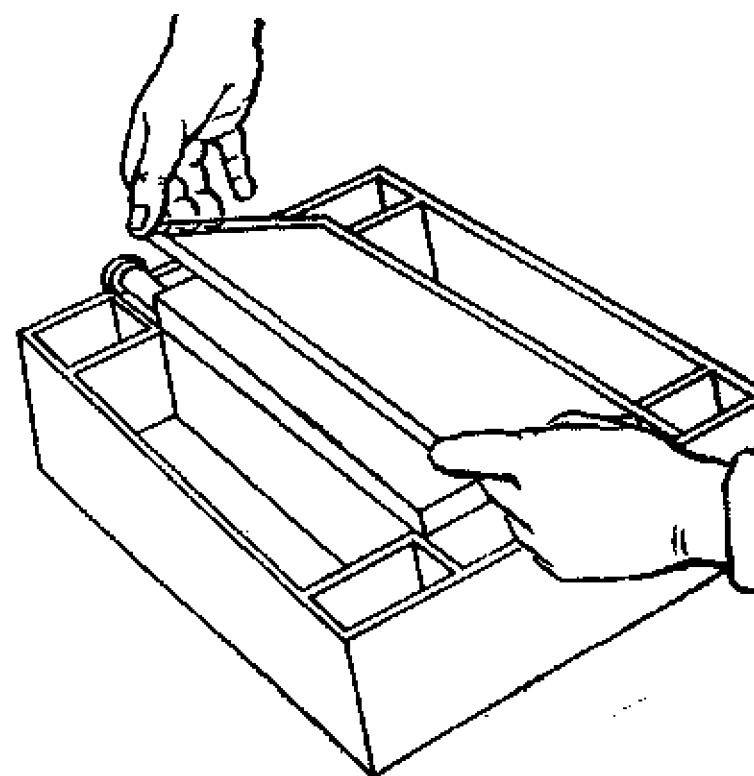


Рис. 8. Укладка стеклянной пластины с гелем на трафарет

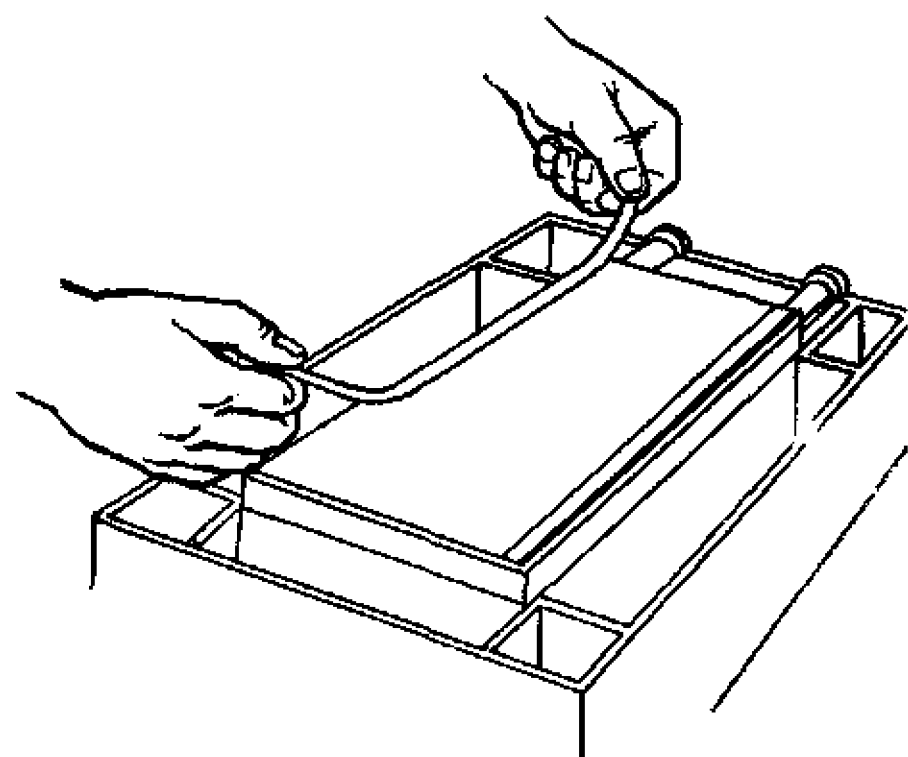


Рис. 9. Наложение на гель электродной полоски фильтровальной бумаги

наченные для ПААГ, покрыты тончайшим слоем ковалентно связанного с ними акриламида, а пленки для агарозы точно так же обработаны агарозой. Благодаря этому в лабораторных условиях соответствующие гели прочно связываются с пленками. Выпускаются и силиконированные полиэфирные пленки, не прилипающие к гелям и полезные для их сохранения во влажном виде.

Перед установкой на столик прибора готовой пластинки ПААГ или геля, полимеризованного на стеклянной пластинке в лаборатории, под них подкладывают специальный трафарет с сеткой, которую достаточно хорошо видно через гель (рис. 7). Это удобно как для параллельного расположения полосок фильтровальной бумаги, на которые накладывают электроды, так и для нанесения препаратов на поверхность геля, как описано ниже. Между трафаретом и охлаждающим столиком, а также между стеклом, на котором полимеризован гель, и трафаретом должен быть обеспечен надежный контакт для эффективного теплоотвода. С этой целью на поверхность, расположенную внизу, наливают немного керосина или парафинового

масла, а верхнюю поверхность (трафарет или пластинку) начинают накладывать с одного конца, так чтобы жидкость между поверхностями ложилась сплошным слоем без воздушных пузырей (рис. 8).

Так же внимательно надо следить и за отсутствием воздушных пузырей между электродными полосками фильтровальной бумаги и поверхностью геля. Полоски шириной 1 см накладывают прямо на гель, по краям его, параллельно друг другу, по трафарету (рис. 9). Пропитывающая их жидкость служит электродным электролитом (см. выше). Бумага должна быть хорошо увлажнена, но без излишков жидкости на ее поверхности. Следует избегать и задержания пузырьков воздуха в толще самой бумаги. Для этой цели бумагу можно смачивать, например, следующим образом: сухую полоску положить на стекло и пипеткой вносить дозированное количество жидкости сбоку в зазор между бумагой и стеклом, замачивая, таким образом, бумагу снизу.

Платиновые электроды прижимают к полоскам влажной бумаги по всей длине разного рода специальными приспособлениями, обеспечивающими их равномерный контакт. В приборе Мультифор этой цели служит прозрачная крышка, по краям которой вмонтированы платиновые проволоки. Крышка одновременно предохраняет гель от высыхания. Прибор комплектуется двумя типами крышек (с электродами, расположенными вдоль длинных или коротких сторон геля). ИЭФ в узком щелочном интервале рН ввиду значительного эндосмоса может приводить к перенасыщению катодной полоски фильтровальной бумаги и выступанию влаги на ее поверхности. Эту влагу надо время от времени удалять кусочком сухой фильтровальной бумаги.

Внесение препарата

ИЭФ в горизонтальной пластине, как и электрофорез, ведут одновременно для многих образцов в параллельных треках. При этом нет необходимости вносить исходные препараты равномерно по сечению пластины, например в колодцы, как это делают при электрофорезе. Можно примириться с тем, что белки будут постепенно диффундировать с поверхности геля в глубину. Фокусирование белков идет из любого первоначального объема и достаточно долго. За это время диффузия в поперечном направлении успеет выравнивать концентрацию белка по толщине пластины.

Препарат в небольшом объеме жидкости (10—15 мкл) можно наносить в виде капли или полоски непосредственно на поверхность геля. Концентрация белка в препарате обычно должна составлять 5—10 мг/мл. Таким образом, обычная загрузка каждого трека — 50—150 мкг белка. Для больших объемов жидкости к поверхности геля слегка прижимают рамочку из плексигласа, куда можно залить до 0,15 мл препарата. Иногда

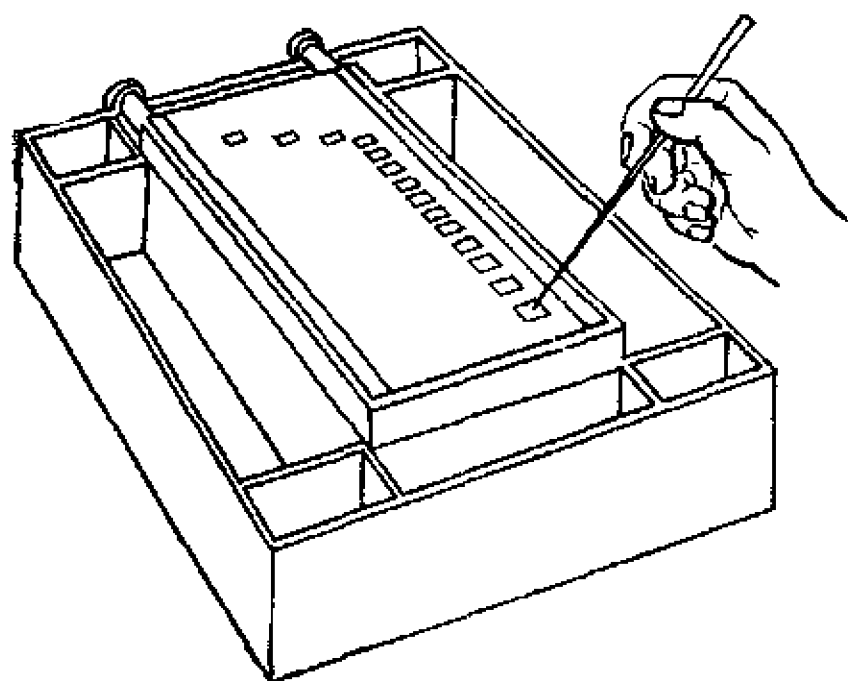


Рис. 10. Нанесение дозированного количества препарата на фильтровальную бумагу

вырезать в форме клина и наложить ее на гель так, чтобы сужение было перпендикулярно к направлению поля. Тогда каждая белковая полоса после фракционирования будет иметь интенсивность, меняющуюся вдоль ее длины, и можно будет выбрать оптимальную ширину фильтровальной бумаги для препарата, т. е. оптимальную загрузку геля. Для точной дозировки исходного количества белка на гель можно положить полоску сухой фильтровальной бумаги, а потом пипеткой нанести на нее определенный объем раствора препарата (рис. 10).

Все эти манипуляции удобно производить, ориентируясь по сетке трафарета, хорошо видной через гель. Вместо этого можно пользоваться и накладным трафаретом в виде жесткой пленки с равномерно расположенными прорезями. Впрочем, иногда при заливке геля в нем все же формируют колодцы для внесения препарата, как это делают при электрофорезе. Однако при этом не рекомендуется углубляться более чем на треть толщины геля, с тем чтобы не слишком нарушать его электропроводность.

Полоски фильтровальной бумаги обычно снимают через час после начала фокусирования. При использовании рамок с большим объемом жидкости время ИЭФ приходится увеличивать. Следует иметь в виду возможность сорбции на фильтровальную бумагу белков из исходной смеси. Эта сорбция может зависеть от pH, поэтому не безразлично, в какой точке градиента накладывать полоску с препаратом. При отработке методики стоит попробовать 3—4 начальных положения вдоль поля. Впрочем, чаще всего сорбция происходит в кислой области, где белки заряжаются положительно, так как целлюлоза всегда несет на себе небольшой отрицательный заряд. При обычной, относительно большой начальной загрузке (50—150 мкг белка на один трек) сорбция на полоску фильтра по абсолютному значению не очень велика — примерно 1 мкг на 10 мм². Однако она может быть избирательной в отношении белков, содержащихся в смеси в небольших количествах.

накладывают насыщенный раствором кусочек поролона. Часто белковым раствором пропитывают квадратик фильтровальной бумаги, который кладут на поверхность геля. Полоска бумаги Whatman 3MM размером 1,5×10 мм впитывает около 10 мкл жидкости. До 2 мкл можно наносить с помощью смоченной хлопчатобумажной нитки.

Для подбора оптимального объема препарата фильтровальную бумагу можно

Выбор места внесения препарата в гель может диктоваться и устойчивостью белка к кислым или щелочным воздействиям. В этом случае важно обеспечить миграцию белка к его изоэлектрическому положению на градиенте со стороны безопасных значений рН и соответственно выбрать место нанесения препарата на пластину. При первом фракционировании, особенно если надежных данных об устойчивости белка нет, стоит попробовать вносить препарат в несколько мест вдоль градиента рН.

В отношении скорости фокусирования белки выгоднее вносить с той стороны геля, где большая их часть сильнее заряжена (кислые белки — со стороны катода, щелочные — со стороны анода), хотя при этом и расстояние миграции может оказаться больше. Помимо уже упомянутых проблем устойчивости к кислым или щелочным воздействиям и сорбции на бумагу, следует также иметь в виду опасность агрегации белков в препарате, которая также может зависеть от рН. Надежный критерий достоверности фракционирования белков — совпадение картин фокусирования при внесении препаратов как со стороны анода, так и со стороны катода. Обратное утверждение не имеет силы: если эти картины не совпадают, то возможно, что лишь одна из них искажена за счет артефактов внесения препарата, но надо выяснить, какая именно.

Присутствие в исходном белковом препарате соли в относительно высокой концентрации (более 0,1 М) может заметно исказить градиент рН и форму полос сфокусированных белков. Этот эффект обычно выражен сильнее, когда препарат вносят с анодного конца градиента. Если в исходном препарате содержалась соль, предотвращавшая выпадение белков в осадок, то иногда оказывается возможным ее заменить на 1%-ный раствор глицина или амфолинов. Такая замена нередко сохраняет растворимость белков, не сказываясь на качестве градиента рН. Эффект обусловлен увеличением дипольного момента растворителя за счет присутствия в нем этих сильнополярных молекул. Разумеется, как и при электрофорезе, исходный препарат не должен содержать нерастворенных частиц белка. Задерживаясь в месте внесения и постепенно растворяясь, такие частицы обуславливают появление характерных «хвостов» у полос белка при фокусировании.

Наконец, белковый препарат можно вносить как с самого начала, так и после образования градиента рН в геле. При работе с лабильными белками предпочтение следует отдать второму варианту, хотя суммарная продолжительность процесса ИЭФ при этом возрастет.

Электрический режим и время ИЭФ

Как и при электрофорезе, для ускорения процесса фракционирования белков желательно использовать максимально допустимую напряженность электрического поля. Ее ограничива-

ет возможность эффективного отвода выделяемого тепла. Приборы для горизонтального ИЭФ типа Мультифор обеспечивают мощность теплоотвода порядка 25—30 Вт. Естественно, что охлаждение тем эффективнее, чем тоньше гель. Однако работать с изготовленными в лаборатории гелями толщиной менее 1 мм затруднительно. Готовые гели выпускаются и меньшей толщины (фирма «Serva»). Заметим, кстати, что температуру охлаждающей жидкости не следует опускать ниже 2° во избежание конденсации влаги на поверхности геля.

При ИЭФ особенно целесообразно пользоваться источниками тока постоянной мощности, так как сопротивление геля по мере утраты зарядов амфолитами непрерывно увеличивается. Напряжение, подаваемое на гель толщиной 2 мм в приборе Мультифор, может возрасти в ходе ИЭФ от начального значения 300—500 В в зависимости от выбранного интервала рН амфолитов до 1000 и даже 1500 В, в то время как сила тока падает от 80 до 20—25 мА. Эти ориентировочные цифры приведены для случая фокусирования в поперечном направлении. Плотность тока определяется напряженностью электрического поля, которая в ходе ИЭФ может изменяться от 20—50 до 100—150 В/см. Это намного больше, чем обычная напряженность поля при электрофорезе. Такая разница обусловлена заметно меньшей плотностью тока при электрофокусировании по сравнению с электрофорезом. При фокусировании белков в продольном направлении при таких же значениях напряженности поля и плотности тока общее напряжение, подаваемое от источника, должно быть больше, а суммарная сила тока — меньше в соответствии с увеличением длины и уменьшением сечения пластины геля.

В указанных условиях для широкого градиента рН 3,5—9,5 процесс ИЭФ большинства белков занимает 1,5—2 ч. Для узких диапазонов рН время ИЭФ приходится увеличивать, так как белки в этом случае заряжены слабее и движутся медленнее; разделение заканчивается за 3—4 ч. При этом предполагается, что через охлаждающий столик циркулирует вода при температуре 10°.

Иногда в результате остаточного эндосмоса (полностью убрать его не удастся) катодная полоска фильтровальной бумаги может оказаться перенасыщенной жидкостью, которая будет видна по краям полоски. Эту жидкость следует удалить фильтровальной бумагой.

Прибор для горизонтального электрофореза FBE-3000 фирмы «Pharmacia» оснащен алюминиевым охлаждающим столиком с тефлоновым покрытием. Благодаря улучшенному теплоотводу мощность, рассеиваемую в геле, можно увеличить до 70 Вт. Лаас и соавторы вели фокусирование белков на этом приборе (используя фармалиты) при напряжении до 3000 В от источника постоянной мощности ECPS 3000/150 производства той же фирмы. Напряженность поля при этом составляла в сред-

нем 350 В/см, а на отдельных участках геля доходила до 600. При температуре охлаждающей воды 8° температура геля устанавливалась примерно одинаковой по всей длине пластины (около 20°). В этих условиях продолжительность ИЭФ сокращается до 1 ч, а белковые полосы заметно сужаются, особенно в зонах с малым содержанием белка [Laas et al., 1980].

Заметим попутно, что надежным критерием достаточности времени ИЭФ для достижения белками равновесных положений является опять-таки совпадение белковых зон при внесении препарата как со стороны анода, так и со стороны катода.

Интересный подход при ИЭФ щелочных белков сыворотки был развит недавно Томасом и Ходсом. Его можно назвать двухстадийным процессом ИЭФ. На первой стадии в пластине ПААГ в присутствии 4 М мочевины и 15% глицерина формировали широкий и нелинейный градиент рН за счет следующей комбинации амфолитов: 0,6% рН 9—11 + 0,4% рН 7—9 + 0,2% рН 3,5—10. На большую часть пластины геля при этом ложился диапазон рН 8,5—10,5, где и оказывались интересующие авторов щелочные белки. Однако разделялись они плохо, так как основное падение напряжения приходилось на прилегавшую к аноду часть пластины геля, где располагались амфолиты нейтральной области рН, отличающиеся худшей электропроводностью. Туда же собирались и кислые белки сыворотки. Этот процесс занимал 3—4 ч. Для осуществления второй стадии фракционирования примерно треть прилегающей к аноду части геля вместе с находящимися в ней нейтральными амфолитами и кислыми белками отрезали бритвой и отбрасывали. Ленту анода переносили на новый конец геля и возобновляли электрофокусирование. Теперь все напряжение источника ложилось на нужную область рН и осуществлялось эффективное фокусирование щелочных белков [Thomas, Hodes, 1978].

Измерение рН

Для сопоставления результатов фракционирования белков, их идентификации и определения значений pI после окончания ИЭФ на пластине производят измерения рН в ряде точек вдоль градиента (рис. 11), используя специальные поверхностные (торцевые) стеклянные электроды с диаметром мембраны 1,5—3 мм и расстоянием между электродами 3—5 мм. Ориентируясь по трафарету, измеряют рН в точках, отстоящих на 1 см друг от друга, и строят кривую фактического градиента рН. Поскольку рН зависит от температуры, измерения проводят, не снимая гель с охлаждающего столика прибора. Еще лучше термостатировать его при рабочей температуре, которая может быть заметно выше температуры охлаждающей жидкости столика. Зависимость величин рН и pI от температуры хорошо заметна при переходе от охлаждения при 4° к комнатной температуре. В ще-

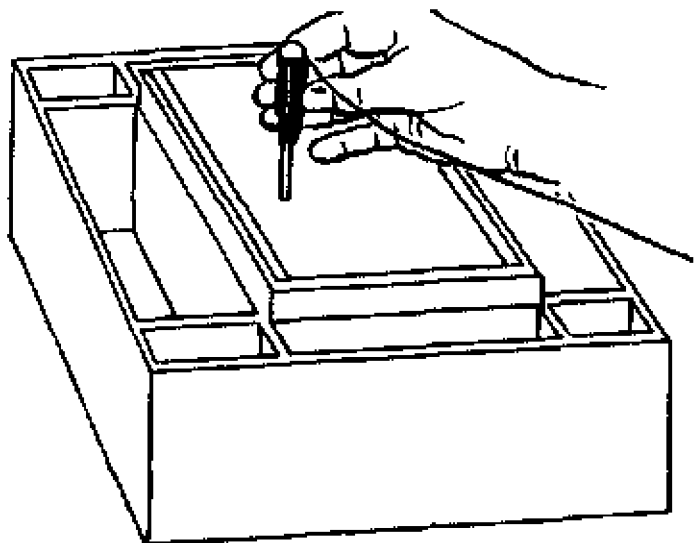


Рис. 11. Измерение pH на поверхности геля торцевым стеклянным микроэлектродом

лочной области изменение pH при таком переходе может составить 0,5 ед. pH.

В ходе измерения pH при выключенном напряжении белковые полосы несколько диффундируют. Перед окраской для их сужения напряжение фокусирования на 10—15 мин включают снова. Фирма «USB» («United States Biochemical Corp.») выпускает набор окрашенных маркеров pH для ИЭФ, состоящий из цитохрома с

($pI=10,6$) и серии его ацетилированных производных с pI 9,7, 8,3, 6,4, 4,9 и 4,1.

Отметим также, что в концентрированном растворе мочевины pH градиента измеряется с некоторым завышением. Например, для 4 М раствора мочевины это завышение составляет около 0,3 ед. pH. Наконец, сами значения pI белков могут несколько изменяться в присутствии высоких концентраций мочевины, сахарозы или глицерина. Это происходит как за счет изменения диэлектрической проницаемости среды, так и за счет конформационных перестроек самих белковых молекул. Уже упоминалось, что эти перестройки могут приводить к изменению степени экранированности и характера диссоциации ионогенных групп белков. В этих условиях использование pI -маркеров, т. е. белков с заранее известными значениями pI , представляется особенно привлекательным. Недавно фирма «Pharmacia» выпустила три набора таких маркеров, содержащих от 8 до 11 белков в каждом. Маркерные белки порознь или в смеси можно вносить на отдельный трек при ИЭФ в пластине или добавлять к белковому препарату в случае вертикального ИЭФ в трубке. Один из маркеров в каждом наборе представлен окрашенным белком, что позволяет следить за ходом фокусирования. Наборы под названием «Focusing Calibration Kit» выпускаются для следующих диапазонов pH: 2,5—6,5, 5—10,5 и 3—10.

Окрашивание белковых зон

Перед окрашиванием белки фиксируют, как обычно, осаждением кислотой, одновременно стараясь удалить из геля амфолиты. Необходимость этого обусловлена тем, что со многими белковыми красителями амфолиты образуют нерастворимые окрашенные комплексы. Обычно гель после ИЭФ вымачивают в течение 30—60 мин в водном растворе, содержащем 3,5% сульфосалициловой кислоты и 10,5% ТХУ (масса/объем). Затем гель в течение 15 мин промывают в водном растворе уксусной кислоты (8%) и этанола (25%). Окрашивают гель 0,1%-ным раствором обычного для электрофореза белков красителя Кумас-

си ярко-голубого (СВВ R-250) в этой же смеси в течение 10 мин при 60°. Избыток красителя отмывают в течение 12—18 ч тем же растворителем, с несколькими его сменами.

По внешнему виду гель, окрашенный после ИЭФ белков в нескольких параллельных треках, мало отличается от геля после электрофореза, если не считать того, что белковые полосы обычно уже и более резко очерчены.

Окрашивание и отмывку удобно производить в ванночке с подъемной сеткой, на которую и кладут пластинку с гелем. Такое приспособление не будет лишним, поскольку гель при окрашивании и отмывке нередко отделяется от стеклянной пластинки и может при вынимании из раствора соскользнуть с нее и сломаться. Для дальнейшего хранения окрашенного геля его следует предварительно подержать около часа в 10%-ном растворе глицерина в той же смеси. Затем гель вместе с пластинкой можно обернуть смоченным целлофаном и в таком виде высушить при комнатной температуре или при 50°. Благодаря глицерину пленка высушенного геля сохраняет прозрачность и не трескается. Высушенный без глицерина ПААГ оказывается мутным и хрупким. Гели, снятые со стеклянной пластинки, хорошо сушить на рентгеновской или фотопленке, с которой предварительно смыли эмульсию. Влажный гель надежно прилипает к нитроцеллюлозной пленке и высыхает на ней при комнатной температуре или при обдувании его теплым воздухом без деформаций и отслаивания. Готовые пластинки типа «PAG plates» можно сушить, не заворачивая их в целлофан.

Быстрая окраска. Можно окрашивать гели и 0,075%-ным раствором красителя СВВ G-250 в 3,5%-ном водном растворе хлорной кислоты. При растворении красителя суспензию перемешивают в течение часа, а затем фильтруют через бумажный фильтр. Гель окрашивают в течение часа при комнатной температуре. Фиксация и окраска белков происходят одновременно; амфолиты при этом окрашиваются слабо. Затем гель споласкивают 3,5%-ным раствором HClO_4 2—3 раза по 5 мин. Белки четко проступают в виде синих линий на бледно-оранжевом фоне. Чувствительность такой окраски — ниже, чем в предыдущем варианте, но выигрыш во времени очень существенный.

Безфоновые методы окраски. Ригетти и Дрисдаль предложили метод окрашивания гелей после ИЭФ, в котором высокая чувствительность сочетается с низким уровнем фона. Гель погружают на 4—6 ч в 0,1%-ный раствор сернокислой меди (CuSO_4) в смеси уксусной кислоты, этанола и воды (19:25:65 по объему), содержащий также 0,05% красителя СВВ R-250. Сернокислая медь препятствует окрашиванию амфолитов. Гель отмывают сначала в течение 4 ч в том же растворе, но содержащем 0,01% красителя, затем в смеси тех же растворителей, но в несколько иной пропорции (1:1:8). Манипулировать с гелем следует в перчатках, так как метод достаточно чувствителен

для выявления отпечатков пальцев на поверхности геля [Righetti, Drysdale, 1976].

Ригетти и Чиллеми приводят вариант окрашивания с использованием красителя СВВ G-250, при котором используется серная кислота и амфолины не прокрашиваются. К 0,2%-ному водному раствору красителя они рекомендуют прилить равный объем 2 н. раствора H_2SO_4 , перемешивать в течение 3 ч, затем смесь отфильтровать и к прозрачному фильтрату коричневого цвета добавить $\frac{1}{9}$ объема 10 н. раствора КОН. Раствор приобретает пурпурную окраску. Наконец, в него добавляют ТХУ до конечной концентрации 12% (вес/объем). Полученный раствор зеленовато-голубого цвета готов к употреблению. Гель выдерживают в нем при покачивании в течение 3 ч, потом переносят в воду, где синий цвет окрашенных полос еще усиливается. Фона нет, так что отмывать гель не нужно.

Разработанный метод позволил авторам осуществить ИЭФ пептидов в пластинах 7%-ного ПААГ ($C=4$), полимеризованного в 2%-ном водном растворе амфолинов для диапазона рН 3,5—10 в присутствии 8 М мочевины. Нечувствительный к присутствию амфолинов метод окрашивания играет здесь решающую роль, так как нет возможности осадить пептиды и вымыть из геля амфолины — первые приходится окрашивать в присутствии вторых. Мочевину вводят в гель во избежание агрегации пептидов. Впрочем, ее можно заменить добавками диметилсульфоксида или диметилформамида [Righetti, Chillemi, 1978].

Определенный интерес представляет недавно предложенный способ окрашивания белков после ИЭФ красителем «быстрый зеленый» («Fast Green»). Чувствительность этого способа в 2—3 раза меньше, чем при окрашивании СВВ R-250, однако Fast Green тоже не окрашивает амфолиты. При фракционировании пептидов уменьшение чувствительности может оказаться существенным недостатком, но при работе с белками отпадают необходимость вымывания амфолитов из геля и связанная с неполнотой такого вымывания неопределенность фона при окрашивании. Используют 0,25%-ный раствор красителя в 10%-ном растворе уксусной кислоты. Перед употреблением его следует дважды профильтровать. Максимальная окраска белков в геле развивается за несколько минут, однако отмывка не связавшегося с белком красителя смесью, содержащей 10% уксусной кислоты и 30% метанола, занимает примерно сутки. Достоинством данного метода является и тот факт, что линейная зависимость интенсивности окрашивания сохраняется до втрое больших концентраций белка в полосе, чем при использовании СВВ R-250 [Allen et al., 1980].

Еще один своеобразный вариант обнаружения полос пептидов в присутствии амфолитов — «негативная» окраска. Тонкие гели быстро сушат, а затем в течение 3—5 мин подвергают действию паров йода. Йод обратимо сорбируется на амфолитах, образуя интенсивно окрашенный коричневый фон. Полосы пеп-

тидов остаются бесцветными — их можно вырезать. Иод легко сублимируется и улетает [Gianazza et al., 1980a].

Окрашивание в две стадии. В некоторых случаях, когда необходимо выявить белковые полосы, очень сильно различающиеся по своей интенсивности, операцию окрашивания имеет смысл провести в две стадии. На первой стадии гель окрашивают сравнительно малочувствительным способом, который позволяет различить границы близко расположенных интенсивных белковых полос. При использовании высокочувствительных методов окрашивания такие полосы нередко кажутся слившимися в одну за счет прокрашивания белка, диффундирующего в промежуток между ними. Промыв гель, приступают ко второй стадии — окрашивают его одним из чувствительных способов для выявления слабых полос белка, оставшихся неокрашенными на первой стадии.

В качестве слабого красителя для первой стадии можно использовать «Light Green SF». Пластину геля вымачивают в 5%-ном растворе ТХУ для фиксации белков и вымывания основной массы амфолитов, переводят ее в смесь метанол — вода — уксусная кислота (33:66:10), а затем окрашивают 0,2%-ным раствором красителя в той же смеси. Продолжительность окрашивания в пределах 0,5—2 ч подбирают в зависимости от толщины геля и интенсивности полос белка, которые желательно выявить на этой стадии. Гель отмывают той же смесью растворителей и далее окрашивают одним из описанных высокочувствительных способов.

Ферментативные реакции. Повышенной чувствительности и избирательности окрашивания белков после ИЭФ можно достичь в тех случаях, когда удастся использовать специфические ферментативные реакции, дающие окрашенные продукты. Несмотря на отсутствие в растворах соли, многие ферменты сохраняют при ИЭФ не только растворимость, но и специфическую активность. Этому способствуют находящиеся в растворе амфолиты. Однако в некоторых случаях целесообразно преодолеть буферный эффект амфолитов и изменить pH раствора до значения, оптимального для данной реакции. Этого можно добиться либо внесением кусочка геля в сильно забуференный раствор других ингредиентов ферментативной реакции, либо предварительным кратковременным вымачиванием геля в нужном буфере с концентрацией 0,1—0,2 М (средняя молярность каждого из амфолитов при 2%-ном их суммарном содержании в растворе составляет 0,02—0,05 М).

Иногда утрата ферментативной активности сфокусированных белков может быть связана с хелированием амфолитами каких-либо металлических кофакторов. Эту активность нередко удастся восстановить инкубацией геля в растворе соли соответствующего металла. Как и после электрофореза, можно снимать зимограммы путем наложения на гель после ИЭФ пластинки агарозы или слоя фильтровальной бумаги, пропитанной раство-

ром необходимых субстратов и дополнительных ферментов для осуществления цепи реакций, приводящей к образованию окрашенного продукта [Wadström, Smith, 1975]. Подробнее эти подходы были рассмотрены ранее [Остерман, 1981].

В качестве иллюстрации приведем пример анализа изозимов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из лизатов эритроцитов человека [Vergnes, 1979]. Содержание и изозимный состав этого фермента в крови представляет интерес для медицины. Отклонения от нормы здесь могут приводить к острым явлениям гемолиза в ответ на употребление в пищу определенных продуктов или использование некоторых медикаментов, например сульфамидов. Изозимы глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы пациентов с различными заболеваниями крови, в том числе с острой гемолитической анемией, фракционировали методом ИЭФ в горизонтальной пластинке ПААГ (рН 5—8,5) на приборе Мультифор. Окрашивание фермента проводили за счет реакции восстановления НАДФ с переброской электрона в конце цепи с помощью феназинметасульфата на тетразолиевую соль (МТТ), дающую сильноокрашенный продукт [Остерман, 1981].

Здесь не имеет смысла описывать приемы автордиографии и флюорографии, элюции и счета радиоактивности, используемые при ИЭФ радиоактивных белков в гелях, поскольку эти вопросы подробно рассмотрены в части III. Упомянем и о возможности сочетания ИЭФ с иммунохимическими подходами, подробно рассмотренными в части II.

ИЭФ В ТРУБКАХ ПААГ

Этот вариант ИЭФ в последнее время применяется главным образом для фракционирования белков в первом направлении при двумерном их разделении, однако его можно использовать и самостоятельно. Для улучшения охлаждения ИЭФ проводят в трубках с внутренним диаметром 2,5—3 мм и длиной 10—20 см. Равномерность и эффективность теплоотвода здесь настолько существенны, что следует применять охлаждение трубок жидкостью с принудительной ее циркуляцией. При этом для обеспечения стабильности переходной зоны рН между границей геля и электродами стараются по возможности уменьшить объемы электродных резервуаров и максимально приблизить электроды к торцам геля. Описана специальная конструкция прибора для этой цели [Righetti, Drysdale, 1971]. Впрочем, в большинстве случаев вполне удовлетворительные результаты могут быть получены и в обычных приборах для электрофореза в вертикальных трубках с жидкостным охлаждением, например «Bio-Rad 155». Требования к чистоте трубок при ИЭФ еще более высоки, чем при электрофорезе.

Соображения, касающиеся состава геля, концентрации и пропорций амфолитов, остаются здесь теми же, что и для горизонтальных пластин ПААГ. Отметим, однако, что опасность эндо-

смоса при ИЭФ в трубках обусловлена не только присутствием остатков акриловой кислоты в ПААГ, но и наличием поверхностных зарядов на стекле. Для уменьшения эндосмоса внутреннюю поверхность стеклянных трубок силиконируют. Можно использовать и трубки из плексигласа или других прозрачных пластмасс, не создающие дополнительного эндосмоса, хотя условия теплопередачи при этом несколько ухудшаются. ПААГ хуже связывается с силиконированной поверхностью стекла или пластмассой, чем с чистым стеклом, однако при ИЭФ это менее существенно, чем при электрофорезе. Белки нередко фокусируются в виде периферических колец, а не дисков, и становятся тем самым даже более доступными для окрашивания и тестирования по биологической активности. Кроме того, облегчается задача извлечения тонких столбиков геля — для этого часто бывает достаточно напора воздуха с одного из концов трубки.

Заполнение трубок смесью мономеров акриламида, амфолитов и глицерина удобно осуществлять с помощью пастеровской пипетки, подавая эту смесь под небольшим давлением от надетой на пипетку резиновой «груши». При этом ввиду того, что раствор довольно вязок, а диаметр трубки — мал, следует особенно внимательно следить за отсутствием воздушных пузырей. Сначала выдавливают остатки воздуха из кончика пипетки, потом опускают его до закрытого парафильмом дна трубки и по мере ее заполнения поднимают кончик пипетки так, чтобы он все время оставался под поверхностью жидкости. Затем на смесь осторожно наслаивают воду или изобутанол и оставляют ее полимеризоваться. Впрочем, форма торцевой поверхности геля при ИЭФ не играет такой важной роли, как при электрофорезе.

При ИЭФ в пластинах ПААГ и трубках существенно должны различаться способы внесения препарата, поскольку в трубке его уже нельзя нанести на любой участок геля (и градиента pH). Здесь остаются только две возможности: либо вносить белковый препарат в весь объем смеси мономеров до их полимеризации, либо наслаивать его на торец геля в непосредственном соседстве с электродными электролитами. Первый вариант не всегда выгоден, особенно для малых объемов препарата. Кроме того, в этом случае неизбежно имеет место взаимодействие белка с радикалами персульфата аммония, а также воздействие на него повышенной температуры в процессе полимеризации геля. В большинстве случаев белковый препарат вносят на торец геля в объеме 10—50 мкл раствора амфолитов с добавлением в него примерно 10% глицерина или сахарозы. Белки, как правило, следует оберегать от непосредственного контакта с электродными электролитами. Для этого рекомендуется после сборки прибора и заливки в верхний резервуар электролита вытеснить его из верхней части каждой трубки раствором амфолитов, а уже затем под него подслаивать растворы исходных препаратов.

При ИЭФ в трубках концентрацию электролитов (NaOH и H_3PO_4) можно снизить до 10—20 мМ, т. е. уменьшить в 50—100 раз по сравнению с той, которую используют для горизонтальных пластин, поскольку объем электролита, приходящийся на единицу площади сечения геля в трубке, во много раз больше, чем для пластины, где весь этот объем ограничен жидкостью, пропитывающей полоску фильтровальной бумаги. Нередко в качестве католитов используют разбавленные растворы этилендиамина, этаноламина и триэтиламина. Как и для пластин, при использовании градиентов рН, сдвинутых в сторону от нейтральной области, в качестве одного из электролитов часто берут смесь нейтральных амфолитов, чтобы избежать опасности образования слоя чистой воды.

Выбор знака верхнего электрода связан с тем, что белковый препарат вносят на гель сверху. При этом следует учесть как соображения устойчивости белка при кислых или щелочных значениях рН амфолитов, располагающихся по концам градиента, так и желательность максимального начального заряда белка для увеличения скорости его миграции в геле. Степень устойчивости белка к экстремальным значениям рН может диктовать и момент внесения препарата. Если белок вносят после предварительного фокусирования амфолитов, то он быстрее достигнет своего равновесного положения. Это может иметь первостепенное значение для сохранения биологической активности, если только миграция через область рН конца градиента не представляет для данного белка опасности. В противном случае белковый препарат приходится наносить на гель до начала ИЭФ, когда смесь амфолитов еще имеет среднее значение рН.

Разбавленные белковые растворы можно наносить на гель порциями, одну за другой. О завершении перехода белков в гель можно ориентировочно судить по проникновению в него следовых количеств красителя бромфенолового синего, который в этом случае подмешивают к препарату (если его вносят с катодного конца градиента). Количество белка берут обычно из расчета 1—10 мкг на сфокусированную зону. Такое количество надежно обнаруживается окрашиванием. Если далее предполагают фракционировать белки во втором направлении, то загрузку следует увеличить. Ее предельная величина зависит от растворимости белка в изоэлектрической точке. О способах ее увеличения сказано ниже. Для ориентировки можно считать, что 50 мкг белка в полосе — верхний предел загрузки ПААГ при ИЭФ в трубках диаметром 3 мм.

Для выбора рабочего режима, не приводящего к перегреванию геля, можно исходить из ориентировочного значения 0,25 Вт рассеиваемой тепловой мощности для стеклянной трубки длиной 10 см и диаметром 3 мм при толщине стенок 1,5 мм и охлаждении циркулирующей жидкостью с температурой 4°. Это означает, что максимально допустимый начальный ток должен составлять примерно 0,5 мА на трубку вплоть до того момента

(через 30—60 мин), когда для поддержания этого тока потребуется напряжение около 500 В, после чего дальнейшее увеличение напряжения лучше приостановить и примириться с некоторым снижением силы тока. Примеры выбора условий и режимов ИЭФ в трубках будут приведены ниже при подробном анализе метода двумерного фракционирования белков, предложенного О'Фарреллом, где ИЭФ используется в первом направлении.

Для измерения истинного распределения рН вдоль градиента в цилиндрике геля, извлеченном из трубки, приходится разрезать гель на короткие участки одинаковой длины и элюировать амфолиты из них водой или (лучше) 0,01 М раствором хлористого калия. Во избежание чрезмерного разбавления амфолитов объем элюата не должен более чем в 5 раз превышать объем геля. При этом следует избегать закисления раствора в щелочной области градиента за счет поглощения углекислого газа из атмосферы, для чего необходимо измерять рН немедленно после элюции, а элюирующую жидкость предварительно прокипятить. Можно пользоваться и торцевыми электродами для измерения рН непосредственно в геле после его извлечения из трубки.

Для окрашивания белков в цилиндриках геля используют те же приемы, что и для пластин. Окрашенные гели иногда денситометрируют с помощью сканирующих устройств, которыми оборудованы многие современные спектрофотометры. Об ограничениях метода денситометрирования окрашенных белковых полос для оценки содержания в них белков подробно сказано в первой книге [Остерман, 1981].

В качестве иллюстрации использования метода ИЭФ в трубках процитируем недавнюю работу по разделению и определению рI гистонов печени быка [Valkonen, Piha, 1980].

Гистоны извлекали из очищенных ядер 0,2 н. раствором H_2SO_4 . Трубки диаметром 5 мм и длиной 24 см перед заливкой продували азотом. В смесь мономеров, содержащую 5% акриламида, 0,16% метиленбисакриламида, 0,4% ТЕМЭД и 0,033% персульфата аммония в 6,25 М растворе мочевины, добавляли амфолины («LKB») диапазонов рН 9—11 (0,9%) и 3—10 (0,2%). После обычной деаэрации перед внесением персульфата через смесь продували азот. Анолит (0,025 М H_3PO_4) и католит (0,05 М NaOH) также деаэрировали перед использованием. ИЭФ вели в приборе марки «Shandon SAE-2734» с охлаждением циркулирующей водой при 4°. В течение двух часов проводили предфокусирование при токе 0,5 мА на трубку, затем наносили на каждую трубку по 100—500 мкг суммарного препарата гистонов в 50—500 мкл 6,25 М раствора мочевины. Начальная сила тока составляла 1 мА на трубку. Фокусирование вели в режиме постоянной мощности с ограничением напряжения до 400 В. Равновесие достигалось через 20 ч. Градиент рН после извлечения геля измеряли через каждые 0,5 см торцевыми электродами в атмосфере азота. Фиксировали белки и вымывали амфолины пятью сменами 30%-ного раствора ТХУ. Окрашивали гель 0,05%-ным раствором СВВ R-250 в 20%-ном водном растворе ТХУ с 5% сульфосалициловой кислоты. Отмывали гель в 10%-ном растворе уксусной кислоты, содержащем 10% изопропанола.

Авторы определили следующие значения pI для пяти главных гистонов: 8,9 для H1, 9,8 для H3, 9,9 для H2B, 10,1 для H2A и 10,25 для H4. Всего было обнаружено 12 полос главных гистонов и субфракций. На рис. 12 картина ИЭФ гистонов сопоставлена с их электрофореграммой в ПААГ. Преимущества ИЭФ в отношении качества фракционирования очевидны.

ИЭФ В ГОРИЗОНТАЛЬНЫХ ПЛАСТИНАХ АГАРОЗЫ

ПААГ малой концентрации вполне пригоден для ИЭФ белков относительно небольшой молекулярной массы. В случае крупных белков ненужное при ИЭФ трение о гель существенно замедляет достижение равновесия, поэтому предпочтение следует отдать крупнопористым и прочным гелям агарозы². До последнего времени использование даже специально разработанной агарозы марки «LE» (фирмы «Miles») было связано со значительно бóльшим, чем у ПААГ, уровнем эндосмоса. Недавно фирма «LKB» выпустила в продажу предназначенную специально для ИЭФ агарозу марки «Agarose-EF» с очень слабо выраженным эндосмосом ($m_r = -0,005$). Такая агароза вполне пригодна для фокусирования белков с молекулярной массой до 900 тыс., например иммуноглобулинов типа IgM. Аналогичный, хотя и несколько хуже очищенный препарат, поставляет фирма «Serva» под маркой «Agarose Serva without EEO» ($m_r = -0,01$).

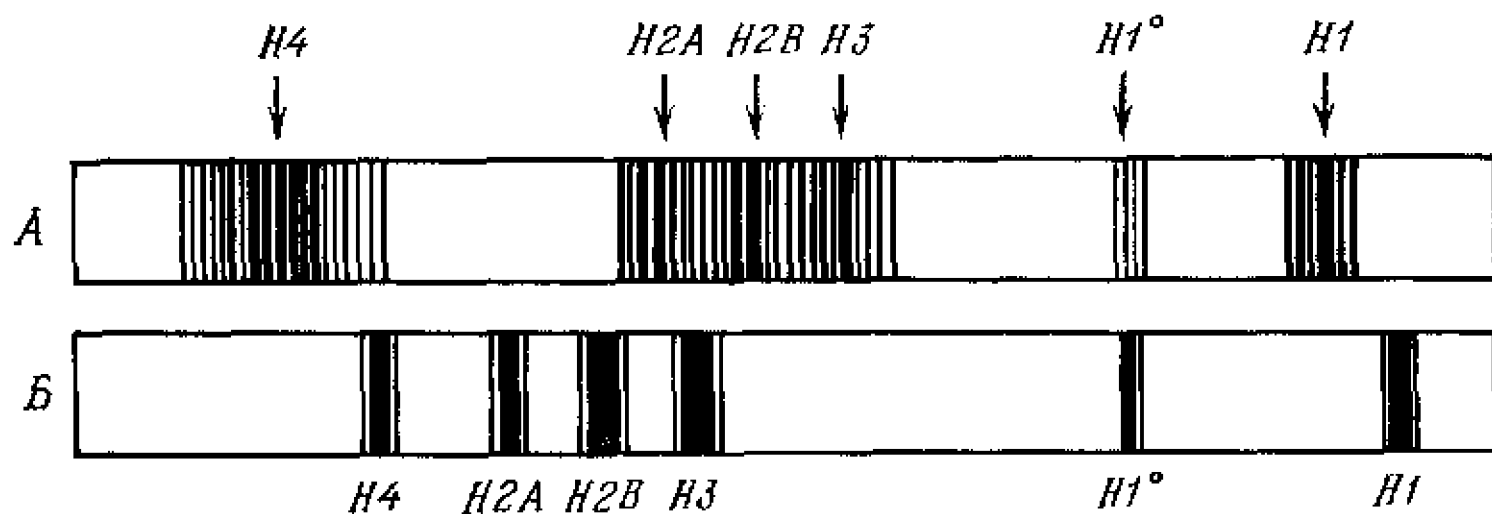


Рис. 12. Фракционирование гистонов в трубках ПААГ с помощью электрофореза (А) и ИЭФ (Б) [Valkonen, Piha, 1980]

Фирма «Pharmacia» недавно начала выпуск агарозы для ИЭФ под маркой «Agarose IEF». В максимально очищенную агарозу, содержащую, тем не менее, неизбежный минимум отрицательных зарядов, фирма вносит строго дозированное количество прочно связанных с матрицей положительно заряженных групп. В результате такой обработки эндосмос при использовании этой агарозы сведен почти до нуля. Точнее, он практически отсут-

² Впрочем, до сих пор недостаточно изучены возможности использования для ИЭФ полиакриламидных гелей, сильно сшитых ($C > 20$) диаллилтартардиамидом. Такие гели имеют крупные поры, легко пропускающие молекулы с миллионной массой; они прозрачны и к тому же растворимы в иодной кислоте [Остерман, 1981].

ствуется для фармалинов в диапазоне рН 5—8. Для узких диапазонов рН в щелочной области «катодный дрейф» градиента рН все же имеет место, а в узких диапазонах кислой области вместо него наблюдается «анодный дрейф» — градиент постепенно сдвигается в сторону анода. По-видимому, степень протонирования положительно заряженных групп в агарозе зависит от рН. Для фармалинов диапазона рН 3—10 градиент рН в ходе ИЭФ становится более пологим, чем первоначальный, так как щелочная его часть дрейфует к катоду, а кислая — к аноду.

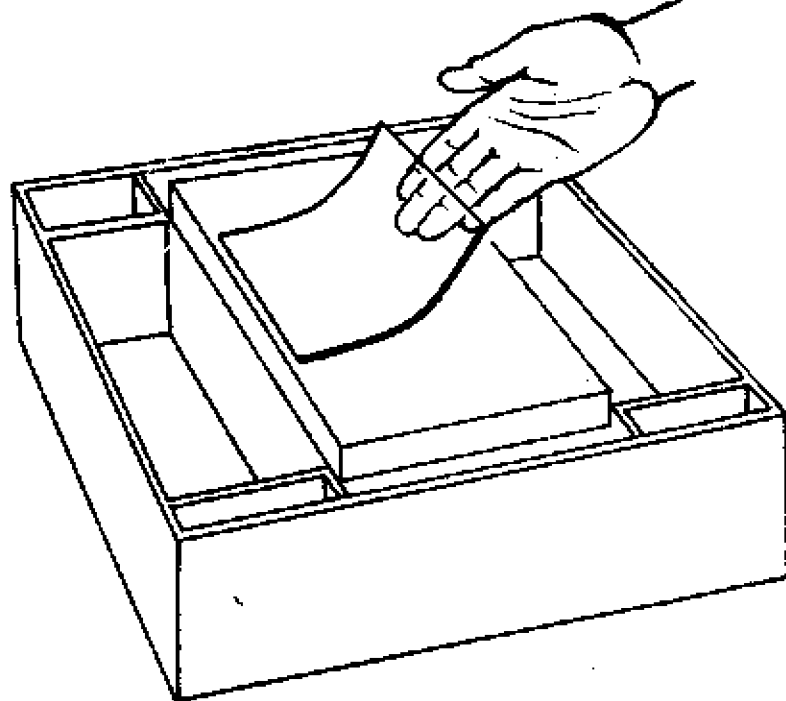


Рис. 13. Укладка геля агарозы на охлаждающий столик прибора «Мультифор»

Уже упоминалось, что эффект эндосмоса снижается при увеличении вязкости пронизывающей гель жидкости. В гелях агарозы для этой цели обычно используют сорбит в концентрации 10—12%. Его растворяют в воде, затем насыпают на поверхность раствора сухую агарозу, дают ей набухнуть и осесть и, как обычно, нагревают раствор на кипящей водяной бане до тех пор, пока не прекратится выделение пузырей воздуха, что свидетельствует о полном растворении агарозы. Колба с раствором при этом должна быть хорошо закрыта. Амфолиты вносят перед заливкой, после охлаждения раствора до 60—70°.

Заливать пластину удобно открытым способом, нанося дозированный объем раствора агарозы с амфолитами из подогретой пипетки на пластмассовую подложку, установленную строго горизонтально с помощью регулируемого по уровню столика. Во избежание быстрого и неравномерного застывания агарозы между подложкой и столиком целесообразно положить теплоизолирующую прокладку. Пластина агарозы после полимеризации легко снимается с подложки. При концентрации агарозы 0,8—1% она достаточно прочна, чтобы быть в свободном состоянии перенесенной на охлаждающую плиту прибора для горизонтального электрофореза (рис. 13). Впрочем, фирма «Pharmacia» предлагает и другой вариант. Она поставляет специальные пластмассовые подложки «Gel Bond», на которых путем особой обработки прочно закреплен тонкий слой агарозы. После заливки, которую фирма рекомендует осуществлять с помощью ограничительной рамки, гель агарозы прочно пристает к подложке и далее всю обработку, включая высушивание, проводят на ней. Как и при электрофорезе, пластины агарозы перед использованием для завершения полимеризации следует выдерживать на холоду во влажной камере в течение суток.

Установку пластины геля агарозы в прибор для горизонтального электрофореза, наложение полосок фильтровальной бумаги, пропитанных электролитами, и электродов производят точно так же, как было описано для пластин ПААГ. Отметим только, что в качестве анолитов не следует использовать концентрированные растворы сильных кислот, так как они могут растворять агарозу. Фирма «LKB» рекомендует для этой цели 0,5 М раствор уксусной кислоты, а фирма «Pharmacia» — 0,05 М раствор серной кислоты. В качестве католита можно употреблять 1 М раствор NaOH. Способы нанесения препаратов на гель остаются теми же, что и для ИЭФ в пластинах ПААГ.

При ИЭФ в геле агарозы размером 11×12,5 см и толщиной 2 мм с использованием прибора Мультифор и температурой охлаждающей жидкости 10° рекомендуется мощность тока ограничить уровнем 6,25 Вт. Это примерно вдвое меньше, чем рекомендовано выше для пластины ПААГ, с учетом соотношения их площадей. Здесь сказывается заметно меньшее, чем у ПААГ, сопротивление геля агарозы миграции белков. Для белков среднего размера процесс ИЭФ при такой мощности тока длится около часа. При первом фракционировании белков неизвестной подвижности продолжительность разделения целесообразно увеличить для выяснения времени, необходимого для достижения равновесного состояния. Измерения pH вдоль градиента производят торцевым электродом, как описано выше.

Операции окрашивания и отмывки гелей агарозы отличаются некоторым своеобразием, связанным с тем, что для их ускорения пластину агарозы целесообразно предварительно сжать и высушить. Процедуру начинают с осаждения белков и вымывания амфолитов, для чего пластину помещают на 5 мин в водный раствор, содержащий 10,5% ТХУ и 3,5% сульфосалициловой кислоты. Уменьшение продолжительности этой обработки по сравнению с пластинами ПААГ оправдано значительно большей пористостью 1%-ного геля агарозы. Затем пластину промывают двумя сменами 96%-ного этанола (по 10 мин в каждой) и покрывают смоченным в этаноле листком фильтровальной бумаги. На него кладут еще 4—5 листов сухой фильтровальной бумаги, накрывают стеклянной пластинкой и прижимают ее грузом примерно в 1 кг. За 20 мин пластина геля заметно сжимается. Сняв груз и бумагу, гель агарозы подсушивают феном до состояния тонкой пленки. Эту пленку окрашивают в течение 10 мин 0,11%-ным раствором СВВ R-250 в смеси, содержащей 8% уксусной кислоты и 25% этанола, без подогрева, затем отмывают в трех сменах того же растворителя (по 10 мин) и снова высушивают. Закрепленная на прочной и гибкой пластмассовой подложке тонкая пленка окрашенного геля агарозы удобна для хранения и фотографирования. Из нее можно вырезать представляющие интерес треки сфокусированных белков. Если при ИЭФ использовали гель агарозы без подложки, то ее можно ввести при высушивании, уложив на нее гель перед началом

его сжатия. Для этой цели удобно использовать освобожденную от эмульсии рентгеновскую пленку.

Отметим еще одно преимущество использования агарозы для ИЭФ в пластинах. Благодаря крупнопористости гелей агарозы и, следовательно, легкости выхода из них белков для их идентификации можно использовать иммунофиксацию. Для этого на влажный гель агарозы после окончания ИЭФ накладывают на 12 ч лист фильтровальной бумаги, пропитанной антисывороткой. Выходящие из агарозы в бумагу антигены образуют в ней иммунопреципитаты, которые можно обнаружить одним из методов, подробно описанных в следующей части книги. С помощью такого приема недавно была продемонстрирована микрогетерогенность тироксин-связывающих глобулинов сыворотки человека [Burnett et al., 1980].

Глава 3

ДВУМЕРНОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

МЕТОД О'ФАРРЕЛЛА

В 1975 г. О'Фаррелл опубликовал сенсационные результаты двумерного фракционирования радиоактивно меченных суммарных белков E. coli. В первом направлении он использовал ИЭФ, а во втором — ступенчатый электрофорез в присутствии ДДС-Na с использованием градиента концентрации ПААГ. По окончании фракционирования на пластине методом автордиографии было выявлено около 1100 пятен различных белков (рис. 14). Метод О'Фаррелла получил очень широкое распространение. Разумеется, за 5 лет он претерпел ряд дальнейших модификаций, которые будут рассмотрены ниже, но сначала отметим характерные особенности оригинального метода, избегая деталей, подробно описанных автором в его первой работе [O'Farrell, 1975].

ИЭФ в первом направлении проводили в трубках длиной 13 см с внутренним диаметром 2,5 мм. 4%-ный ПААГ ($C=2,6$) полимеризовали в 9,5 М растворе мочевины с добавлением 2% неионного детергента NP-40 (Nonidet P-40). Амфолины («LKB») в этот раствор вносили до суммарной концентрации 2% (масса/объем), причем 1,6% составляли амфолины диапазона pH 5—7 и 0,4% — pH 3—10. Инициаторные добавки вводили в относительно малых количествах: 0,01% персульфата аммония и 0,07% ТЕМЭД. Полимеризация геля занимала 2—4 ч. При этом сначала на гель наслаивали 8 М раствор мочевины, затем его заменяли указанной выше смесью 9,5 М мочевины и 2% NP-40 с добавлением 5% β-меркаптоэтанола.

Перед установкой трубок в прибор для вертикального электрофореза их нижние торцы приходилось закрывать днализной

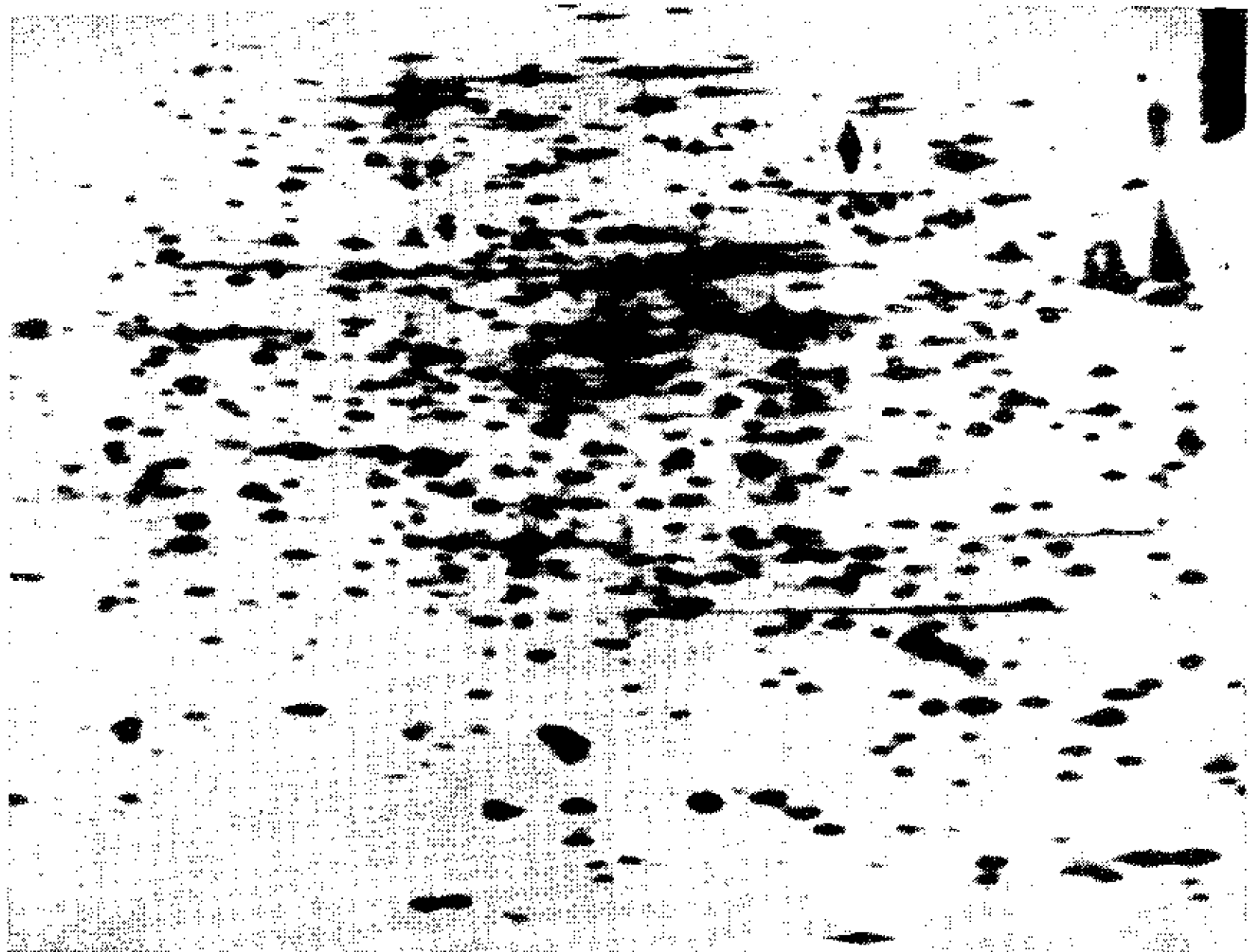


Рис. 14. Распределение пятен радиоактивности при двумерном фракционировании белков *E. coli* по методу О'Фаррелла [O'Farrell, 1975]

мембраной, поскольку в присутствии детергента 4%-ный ПААГ недостаточно прочно связывается со стеклом. Католитом служил 0,02 М NaOH, анолитом—0,01 М H_3PO_4 ; оба раствора деаэрировали и хранили в вакууме. Анод располагался внизу.

Предфокусирование для очистки геля от радикалов проводили в три этапа: 15 мин при напряжении 200 В, затем по 30 мин при 300 и 400 В. После этого католит сливали. Препарат, содержащий 10—20 мкг белка лизата *E. coli*, после обработки ДНКазой вносили на гель в объеме 25 мкл раствора, содержащего 9,5 М мочевины, 2% NP-40 и 5% β -меркаптоэтанола (буфер лизиса клеток). В этом растворе все белковые агрегаты диссоциируют, а сами белки денатурируют. На препарат наслаивали 10 мкл 9 М раствора мочевины, содержавшего 1% смеси амфолинов в той же пропорции (4:1). Вместо сахарозы высокую плотность здесь создает мочевина. Затем трубку осторожно дополняли доверху католитом (0,02 М NaOH). ИЭФ при напряжении 400 В занимало 12 ч; еще на 1 ч напряжение увеличивали до 800 В. По окончании ИЭФ гель выдавливали из трубки и для подготовки его к электрофорезу вымачивали 2 ч при комнатной температуре со встряхиванием в 5 мл 0,5 М Трис-HCl (pH 6,8), содержащего 0,4% ДДС-Na.

Во втором направлении белки разделяли ступенчатым электрофорезом в пластине ПААГ размером 13×14 см и толщиной 0,8 мм. В качестве рабочего геля до уровня на 2,5 см ниже верхнего края пластины полимеризовали экспоненциальный градиент (5—22,5%) ПААГ в 0,375 М Трис-НСl (рН 8,8) с добавлением 0,1% ДДС-На, стабилизированный глицерином. Формирующий гель представлял собой 4,75%-ный ПААГ, полимеризованный в 0,125 М Трис-НСl (рН 6,8) с 0,1% ДДС-На. Клиновидную полость над пластиной для помещения в нее цилиндрика геля первого направления формировали так, как это принято делать при двумерном электрофорезе [Остерман, 1981]. Эту полость заполняли расплавленным 1%-ным раствором агарозы в том же буфере, а затем закладывали в нее цилиндр геля. В качестве верхнего электродного буфера использовали, как обычно при электрофорезе по Лэммли, раствор, содержащий 0,025 М Трис, 0,192 М глицин и 0,1% ДДС-На (рН 8,3) с добавлением бромфенолового синего в качестве лидирующего красителя. Электрофорез длился 5 ч при силе тока 20 мА. За это время полоса красителя достигала нижнего края пластины. Для окрашивания белков после электрофореза использовали 0,1%-ный раствор СВВ R-250 в 50%-ной ТХУ. Перед автордиографией гель высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой от суток до месяца в зависимости от исходной радиоактивности препарата и необходимости выявления слабых пятен. При этом следует иметь в виду, что при увеличении продолжительности экспозиции увеличивается и размер каждого пятна — примерно вдвое при 10-кратном удлинении экспозиции. Соответственно может ухудшаться разрешение близко лежащих пятен.

Во время вымачивания цилиндрика после ИЭФ до 25% белка может вымываться из геля, поэтому О'Фаррелл описал вариант методики без промежуточного вымачивания. При этом цилиндр геля не заплавливали в агарозу, а в верхний электродный буфер вносили первоначально 2% ДДС-На, впоследствии заменяя его нормальным буфером, содержащим 0,1% ДДС-На.

Исходное количество препарата О'Фаррелл варьировал в пределах от 1 до 100 мкг белка. В последнем случае преобладающие белки смеси давали явно перегруженные пятна, но зато могли быть обнаружены белки, содержание которых в исходном препарате было очень низким. Оптимальное количество белка в одном пятне — примерно 0,1 мкг. При перегрузках (более 20 мкг исходной смеси) наблюдались существенные искажения формы некоторых пятен. Обнаруживалось и явление вытеснения белков друг другом — малое пятно при близком соседстве большого оттеснялось из своего нормального положения.

При окраске СВВ R-250, хотя и с трудом, но удавалось обнаружить пятна, содержащие до 0,01 мкг белка. С учетом ограничения исходной загрузки геля это позволяло обнаружить лишь около 400 белков E. coli. Автордиография при 20-дневной экспозиции дает возможность зарегистрировать пятна, содержа-

щие радиоактивный ^{14}C на уровне 1 имп./мин. При радиоактивности исходного белкового препарата порядка 5×10^6 имп./мин это позволяло получить картину, показанную на рис. 14, где обнаруживались белки, представленные в бактериальной клетке (как показывает расчет) одной-единственной молекулой.

Использование высокой концентрации мочевины на всех этапах процесса, начиная с лизиса клеток, необходимо для устранения угрозы агрегации белков. Как всегда, при этом следует опасаться распада мочевины и карбамоилирования белков, что приведет к появлению мультиплетов пятен, расположенных рядом, на одном уровне пластины. Ввиду этого растворы особо чистой мочевины должны быть свежеприготовлены или храниться в замороженных аликвотах. Замечено, что в продажных препаратах мочевины даже наивысшей чистоты встречаются примеси солей, способствующих агрегации белков [Goldsmith et al., 1979], поэтому растворы мочевины следует обязательно деионизировать на ионообменных колонках, как описано выше.

Дублеты и мультиплеты пятен могут также явиться следствием неконтролируемых модификаций белков, ведущих к изменению их pI (окисления остатков цистеина, дезамидирования остатков аспарагина и глутамина и др.). Замечено, в частности, что дублеты появляются при хранении замороженной бактериальной массы при -20° в течение месяца, а в случае лиофилизированных экстрактов *E. coli* — за то же время при -70° .

МОДИФИКАЦИИ МЕТОДА О'ФАРРЕЛЛА

Вымачивание цилиндров геля после ИЭФ по методу О'Фаррелла приводит не только к потере части белков, но и к некоторому размыванию белковых зон. Кроме того, если желательно при электрофорезе во втором направлении на одной пластине сопоставить белки, сфокусированные в разных опытах, то зоны этих белков приходится вырезать вслепую.

Недавно было показано [Jäskle, 1978], что все эти трудности можно обойти путем кратковременной фиксации и окраски белковых полос в цилиндрике геля после ИЭФ таким образом, чтобы это не мешало последующему электрофорезу. По окончании ИЭФ по О'Фарреллу белки фиксировали и окрашивали в течение 10 мин 0,1%-ным СВВ R-250 в растворе, содержащем 10% CH_3COOH и 50% метанола. Отмывали гель 1 ч в том же растворителе, а затем в смеси, содержащей 7% CH_3COOH , 5% метанола и 0,005% СВВ R-250 (последнее для предотвращения десорбции красителя с белка). Фиксированный таким образом цилиндрик геля можно хранить неделями. Перед фракционированием во втором направлении цилиндрик в течение 2 ч вымачивали в 5 мл раствора, содержащего 0,625 М Трис- HCl (pH 6,5), 2,3% ДДС- Na , 5% β -меркаптоэтанола и 10% глицерина, а далее проводили электрофорез так, как описано О'Фарреллом. При выдерживании геля в 2,3%-ном ДДС- Na

осажденные белки вновь растворяются и нормально мигрируют в электрическом поле пластины. Краска от белков отделяется и под действием поля уходит к аноду впереди всех белков. Описанный способ окрашивания открывает возможность сравнения между собой белков, сфокусированных в разных опытах. Для этого их зоны надо вырезать из соответствующих замороженных гелей после ИЭФ и собрать вместе — в ряд карманов пластины для электрофореза во втором направлении.

Разрешающая способность метода О'Фаррелла может быть увеличена за счет удлинения каждого из двух направлений фракционирования. Ворис и Юнг проводили ИЭФ в трубках длиной 33 см с внутренним диаметром 3 мм, а для электрофореза использовали пластины размером 40×40 см [Voris, Young, 1980]. Трубки заполняли с помощью пастеровской пипетки, внимательно следя за отсутствием пузырьков воздуха. Предфокусирование и ИЭФ проводили при тех же значениях напряженности электрического поля, что и О'Фаррелл, т. е. при напряжении, в 2,5 раз большем. Соответственно и время ИЭФ увеличивали до 20 ч. От стенок трубки гель отслаивали тонкой полиэтиленовой трубкой, накачивая в нее воду, что придает ей некоторую жесткость.

В одной из стеклянных пластинок формы для геля второго направления делали вырез, подобно тому как это предусмотрено в приборе Стадиера для электрофореза в вертикальных пластинках [Остерман, 1981]. Верхний электродный резервуар из плексигласа (который при ИЭФ не должен быть объемистым) имел точно такой же вырез в передней стенке. Этот резервуар через резиновые прокладки зажимами крепили прямо на пластинки геля, совмещая вырезы. При полимеризации верхнего, формирующего геля на поверхность раствора в вырез пластинки укладывали стеклянную палочку диаметром 3 мм (при толщине геля 0,8 мм). Таким образом, на торце геля после полимеризации образовывался желобок. В него с листа парафильма скатывали длинный и тонкий цилиндр геля, расправляли его и заливали расплавленным 1%-ным раствором агарозы. Пластины геля до уровня верхнего резервуара погружали в 20-литровый аквариум, заполненный нижним электролитом. Электрофорез вели в течение 10 ч при силе тока 50 мА. После фракционирования 20 мкг белка из клеток тимуса крысы с исходной ^{14}C -радиоактивностью $5 \cdot 10^6$ имп./мин автордиография при двухнедельной экспозиции выявляла 1750 пятен. В том же объекте при использовании гелей обычного размера обнаруживаются только 500 пятен.

Неионный детергент NP-40, используемый О'Фарреллом, необходим только для полного растворения всех (в том числе крупных и гидрофобных) белков бактериальной клетки. Эта необходимость отпадает при фракционировании легко растворимых белков, например низкомолекулярных. В подобной ситуации Голдсмит и соавторы при ИЭФ в первом направлении

вовсе исключили детергент, уменьшили концентрацию мочевины до 8 М и использовали 5%-ный ПААГ [Goldsmith et al., 1979]. Это позволило им вести ИЭФ не в трубке, а в горизонтальной пластине толщиной 1 мм одновременно для нескольких сопоставляемых препаратов. Препараты вносили с дубликатами, так что один из двух треков каждого препарата можно было вырезать, окрасить и использовать для сопоставления с картиной ИЭФ остальных препаратов.

Для улучшения разделения низкомолекулярных белков в 10%-ном ПААГ второго направления в рабочий буфер системы Лэммли авторы вводили еще и 6,4 М мочевины. Особых мер предосторожности требует операция вымачивания полоски геля после ИЭФ в растворе, содержащем 0,063 М Трис-НСl, 1% ДДС-Na и 10% β -меркаптоэтанола. Здесь легко потерять много белка, поскольку его молекулы имеют небольшие размеры и легко диффундируют. Авторы цитируемой работы отработали следующую, довольно сложную процедуру «вымачивания» и переноса геля. Полоску, вырезанную из пластины первого направления, кладут на полиэтиленовую пленку и по ней пипеткой равномерно распределяют всего лишь 1 мл указанного буфера. Жидкость вне полоски немедленно отсасывают пастеровской пипеткой. Всего лишь одна минута промедления приводит к заметной потере белка.

«Уравновешенную» таким образом полоску геля первого направления на той же полиэтиленовой пленке переносят в форму, где уже полимеризован гель второго направления. Одна из двух стеклянных пластинок формы сделана более длинной, чем другая. К выступающей сверху ее части прижимают пленку с гелем, а затем осторожно шпателем сдвигают полоску с пленки и вводят ее между пластинками формы, постепенно и равномерно прижимая к торцу формирующего геля второго направления. Этот торец должен быть обсушен фильтровальной бумагой, иначе белки смогут выходить из полоски геля и смешиваться, диффундируя вдоль слоя жидкости между полоской и гелем. После установки полоски ее фиксируют заливкой расплавленной агарозой.

Недавно описано двумерное фракционирование белков по методу О'Фаррелла с использованием ультратонких гелей. В первом направлении ИЭФ проводили в пластине толщиной 0,24 мм, а электрофорез второго направления — в пластине толщиной 0,36 мм [Görg et al., 1980].

Также без детергента проводили ИЭФ бромциановых пептидов миозина Эпштейн и Вольф [Epstein, Wolf, 1976]. Для предупреждения возможности неконтролируемого окисления остатков метионина и цистеина радикалами персульфата аммония (что приводит к появлению дополнительных пятен) пептиды окисляли надмуравьиной кислотой. Трубки после ИЭФ разрезали на продольные слои толщиной 2 мм. Средний слой заполиме-

ризовывали в гель второго направления, а крайние использовали для контрольного окрашивания и измерения рН.

Для фракционирования крупных белков ($M > 200\,000$) Хирабаяши проводил ИЭФ в первом направлении в 1%-ном геле агарозы. В трубку диаметром 2,5 мм и длиной 26 см он для ускорения формирования градиента рН заливал последовательно три слоя агарозы: кислый с амфолитами диапазона рН 2,5—5 на высоту 2 см, нейтральный (рН 3—10) на 11,5 см и щелочной (рН 8—10,5) на 4,5 см. Трубка с нижнего конца была закрыта диализной мембраной, и каждый новый слой расплавленной агарозы заливали после застывания предыдущего, NP-40 не использовали, но в каждом слое содержались 7 М мочевины и 0,66 М сорбит. Фокусирование при напряжении 500 В занимало 24 ч при 4°. По его окончании гель выталкивали в другую трубку диаметром 5 мм, заполненную 10%-ным раствором ТХУ с 5% сульфосалициловой кислоты. Этот раствор прокачивали через трубку в течение часа. Мочевина и амфолиты вымывались, а полосы выпавших в осадок белков можно было фотографировать при боковом освещении на темном фоне. Затем столбик геля промывали водой и выталкивали в слой воды над формирующим гелем системы Лэммли для электрофореза во втором направлении. Воду отсасывали, а столбик агарозы фиксировали заливкой 1%-ным агаром. Растворение и обработка белков ДДС-Na происходили в ходе электрофореза. Для этого на столбик агарозы (на высоту 5 мм) наслаивали 2%-ный раствор ДДС-Na в буфере, содержащем 5% β-меркаптоэтанола [Hirabayashi, 1981].

При фракционировании белков гладкого эндоплазматического ретикулума оказалось, что их растворение с помощью NP-40 происходит не полностью. Власук и Вальц обнаружили, что полного растворения этих белков можно добиться совокупностью следующих мер: заменой NP-40 на Тритон X-100, увеличением концентрации мочевины до насыщающей и закислением лизирующего буфера до рН 4,3 соляной кислотой. Около 130 мг растворенного таким образом белка они вносили на гель после формирования в нем градиента рН, причем с анодного его конца (в отличие от метода О'Фаррелла). Это устраняло агрегацию и преципитацию белков на границе геля. Пропорцию амфинов изменяли почти на обратную: 0,5% диапазона рН 6—8 и 1,5% диапазона рН 3—10. ИЭФ в этих условиях обнаруживало 55 полос, а после электрофореза во втором направлении выявлялось 230 пятен белков, входящих в состав гладких мембран [Vlasuk, Walz, 1980].

Аналогичный прием был использован и в другой работе [Stephenson et al., 1980]. Ее авторы исследовали гидрофобные белки внутренней мембраны митохондрий дрожжей. В присутствии циклогексимида, блокирующего синтез белков в цитоплазме, белки митохондрий метили ^{35}S , а затем экстрагировали и фракционировали в первом направлении методом ИЭФ в 4%-ном

ПААГ, полимеризованном в присутствии 8 М мочевины и 2% Тритона X-100. В смесь вносили по 0,6% амфолинов каждого из трех диапазонов рН: 3,5—10, 2,5—4 и 9—11. В качестве католита использовали 0,66 М раствор этилендиамина, в качестве анолита — 0,1 М раствор лимонной кислоты. Для уменьшения осмотического различия между гелем и электролитами в последние тоже вносили мочевину до концентрации 8 М. Для растворения белков авторам пришлось использовать даже ДДС-На, хотя и в умеренной концентрации (2:1 по отношению к белку), а рН лизирующего буфера они снижали до 3,0 добавлением лимонной кислоты. Небольшое количество ДДС-На в препарате не мешало процессу ИЭФ, тем более что и в этом случае препарат вносили с анодного конца геля, где свободный ДДС-На быстро уходит к аноду, а из связи с белком его вытесняет избыток Тритона X-100. Амфолины в раствор препарата не вносили, так как это расширило бы градиент рН за физические размеры геля и привело бы к сужению интервала рН в нем. Предфокусирование геля перед внесением препарата занимало 10 мин. На препарат в трубке наслаивали 10 мкл раствора, содержащего 6 М мочевину, 2%-ный Тритон X-100 и 0,01 М лимонную кислоту. Затем следовал анолит (анод — вверх). ИЭФ проводили при силе тока 1 мА в течение примерно 40 мин, пока напряжение не увеличивалось до 600 В. При этом напряжении ИЭФ продолжали еще 4 ч (сила тока падала до 0,18 мА). Затем для обострения полос напряжение на последние 15 мин увеличивали до 800 В.

Во втором направлении использовали обычный ступенчатый электрофорез с 12,5%-ным рабочим ПААГ в пластине толщиной 1,5 мм. Форма для геля была сделана из плексигласа и имела готовую полость для цилиндрика геля первого направления. Пластины охлаждали интенсивно (со змеевиком), при температуре 10°. Пятна регистрировали флюорографически.

ДДС-На в значительной концентрации (1%) был использован для улучшения экстракции белков из животной ткани перед их двумерным фракционированием по методу О'Фаррелла еще в 1977 г. [Wilson et al., 1977]. Перед ИЭФ ДДС-На вытесняли из комплекса с белком добавлением избытка NP-40 и амфолинов.

Хорст и соавторы для растворения мембранных белков из семян арахиса вместо ДСС-На использовали мочевину при щелочных значениях рН. До 30 мг исходного материала из растертых и обезжиренных эфиром семян суспендировали в 1 мл 9 М раствора мочевины, содержавшего 5 мМ K_2CO_3 (рН 10,3), а также ингибитор протеаз (ФМСФ). Для разрушения агрегатов суспензию обрабатывали ультразвуком. Затем добавляли NP-40 до 2% и дитиотреитол до 0,5%, хорошо перемешивали и освещали центрифугированием. Этот экстракт использовали для ИЭФ в первом направлении по методу О'Фаррелла, загружая его, разумеется, с катодного конца геля [Horst et al., 1980].

В точно такой же системе проводилось растворение белков листьев табака [Nagi, 1981]. Содержащиеся в листьях пигменты и фенольные производные взаимодействуют с белками. Это обуславливает вариации связанных зарядов, в результате чего картина двумерного фракционирования белков по методу О'Фаррелла смазывается. Автор предлагает многоступенчатую процедуру предварительной экстракции пигментов и прочих примесей холодным ацетоном.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ФОРМИРУЮЩЕМСЯ ГРАДИЕНТЕ pH

Окончательное формирование градиента pH и фокусирование белков в этом градиенте требуют много времени, так как при подходе к равновесному положению амфолиты и белки утрачивают заряд и движутся очень медленно. Между тем, сортировка амфолитов по значениям pI и образование градиента pH в основном (как бы «вчерне») происходит быстро. Если вносить белки в гель с одного его конца, например анодного, то уже в самом начале образования градиента pH этот конец закисляется в достаточной степени, чтобы все белки смеси приобрели положительный заряд и начали мигрировать вдоль поля. Заряды белков зависят от их собственных значений pI, поэтому начальные скорости миграции разных белков смеси могут существенно отличаться друг от друга. По мере продвижения вдоль формирующегося градиента pH белки постепенно утрачивают заряд и замедляются, но тоже не одинаково. Раньше всего это произойдет с менее заряженными белками, в данном случае кислыми. Щелочные белки, для которых положение равновесия находится где-то на другом конце градиента pH, будут двигаться быстро почти вдоль всего геля. Происходит разделение белков не в стационарном состоянии фокусирования, а еще до него — в динамическом режиме электрофореза *в формирующемся градиенте pH*. Фракционирование идет по заряду, но с расширенными возможностями, обусловленными изменением pH вдоль геля. Процесс этот требует не больше времени, чем обычный электрофорез при неизменном pH. Момент его окончания выбирается экспериментатором; от равновесного состояния он может быть еще очень далек. Собственно говоря, дело сводится к тому, что явление фокусирования белков используют не до конца, но в такой мере, что уже реализуется его преимущество в разрешающей способности по сравнению с электрофорезом. Единственное, чем приходится пожертвовать по сравнению с истинным ИЭФ — это возможностью определения pI белков.

Этот прием был использован О'Фарреллом и соавторами вместо ИЭФ для разделения белков в первом направлении при двумерном фракционировании [O'Farrell et al., 1977]; он был назван «электрофорезом в формирующемся градиенте pH»

(«nonequilibrium pH gradient electrophoresis», сокращенно «NEPHGE»).

Для фракционирования сложной белковой смеси в трубках первого направления ($130 \times 2,5$ мм) полимеризовали 4%-ный ПААГ в 9,2 М растворе мочевины с 2% NP-40 и 2% амфолинов диапазона pH 3,5—10. В отличие от исходного метода О'Фаррелла, анод располагали вверху. Электролитами служили 0,01 М H_3PO_4 и 0,02 М NaOH. В этом случае во фракционировании участвуют и щелочные белки, которые приобретают наибольший положительный заряд и мигрируют в направлении катода впереди прочих белков (в исходном методе щелочные белки даже не входили в гель, так как препарат вносили со стороны катода). Электрофорез при напряжении 400 В проводили в течение 4—5 ч вместо 12, необходимых для ИЭФ. При этом кислые белки почти достигают равновесного положения фокусирования, а щелочные разделяются только за счет различия скоростей миграции. Градиент pH устанавливается в основном за первые 1,5 ч процесса. По окончании электрофореза цилиндр геля уравнивали, как обычно, в буфере с ДДС-Na и переносили на пластину второго направления для ступенчатого электрофореза в системе Лэммли, как было описано для исходного метода О'Фаррелла.

Если ставится задача разделения только щелочных белков, то ПААГ можно полимеризовать с амфолинами диапазона pH 7—10. Правда, с ними гель полимеризуется труднее, чем с нейтральной смесью амфолинов, поэтому концентрацию персульфата аммония и ТЕМЭД в геле следует удвоить (0,02% и 0,14% соответственно). Присутствие в исходном белковом препарате ДДС-Na мешает фракционированию — связанный с белками ДДС-Na тормозит их миграцию к катоду. Если ДДС-Na необходим для первоначального растворения белков, то перед фракционированием его следует вытеснить из комплексов с белками избытком NP-40. Последний в этом случае вносят не только в раствор препарата (до 2%), но и в раствор мочевины и амфолинов, который наслаивают на препарат (до 5%).

Картина разделения сложной смеси кислых и щелочных белков в первом направлении при использовании амфолинов диапазона pH 3,5—10 получается не очень хорошей. Кислые белки, как было отмечено, успевают сфокусироваться, но это происходит на коротком отрезке кислого участка градиента pH. Щелочные же белки начинают заметно различаться по своей электрофоретической подвижности и соответственно фракционироваться только во второй половине своего пути через гель. Такого рода фракционирование полезно для первоначального обзора всего набора белков. Далее исходную смесь следует в одном эксперименте разделить методом ИЭФ, как описано О'Фарреллом, а в другом — подвергнуть электрофорезу в формирующемся градиенте pH с амфолинами для диапазона pH 7—10 или смесью амфолинов для диапазонов pH 6—8 и 8—10 (по 1% каждого).

В первом случае щелочные белки смеси окажутся вне геля, а во втором — кислые белки будут оттеснены к самому его концу.

Сандерс и соавторы использовали описанный метод для фракционирования гистонов из культивируемых клеток глиомы [Sanders et al., 1980]. Естественно, что гистоны должны быть надежно отделены от ДНК, иначе остатки ДНК в комплексе с гистонами независимо от pH будут сообщать этому комплексу отрицательный заряд, поэтому он не сможет даже войти в гель. Авторы растворяли клетки в 10 М растворе мочевины с добавлением 0,2% ДДС-Na и 0,03 М лизина при pH 4,8. Затем в раствор добавляли 0,4 М NaCl и этим ослабляли комплекс гистонов с ДНК. Однонитевые участки ДНК переваривали нуклеазой S1, затем следовало дробление ультразвуком и уже перед самым нанесением на гель — окончательная диссоциация комплексов и осаждение ДНК протаминсульфатом в концентрации 0,4 мг/мл (трехкратный избыток по отношению к массе гистонов).

Для электрофореза гистонов в формирующемся градиенте pH первого направления авторы отдают предпочтение амфолинам диапазона pH 6—8. Хорошо заряженные гистоны мигрируют быстро, и все фракционирование заканчивается за 2 ч. На 20 мкл исходного препарата в трубке диаметром 2,4 мм из-за наличия в нем 0,2% ДДС-Na наслаивали 10 мкл 8 М раствора мочевины, содержащего 5% NP-40, 0,8% амфолинов pH 5—7 и 0,2% амфолинов pH 3,5—10. На пластине второго направления одновременно с гистонами было выявлено около 130 белков основного характера.

Аналогичным способом недавно были разделены белки хроматина зародыша морского ежа [Kuhn, Wilt, 1980]. Радиоактивную метку в белки вводили *in vitro* при обработке формальдегидом и [^3H]NaBH₄ (см. часть III). Меченый хроматин также растворяли в 10 М растворе мочевины с 0,03 М лизина, но без ДДС-Na, переваривали нуклеазой S1, а затем в раствор вносили 4% NP-40, 5% β -меркаптоэтанола и 4% биолитов диапазона pH 3—10. По-видимому, этого было достаточно для диссоциации гистонов от ДНК. Для электрофореза в формирующемся градиенте pH концентрацию биолитов того же диапазона увеличивали до 4,8% и выравнивали электропроводность вдоль градиента добавлением аргинина, лизина и аспарагиновой кислоты (по 0,8 мг/мл). Режим электрофореза в трубках размером 150 × 2,5 мм включал четыре 5-минутных интервала с повышением напряжения на 100 В в каждом и основное фракционирование в течение 3 ч при 520 В. В работе содержится важное практическое замечание о том, что катодный конец трубки не следует погружать в 0,02 М NaOH глубже, чем на 2 мм. В противном случае щелочь заметно проникает в гель и «сжимает» катодный конец градиента pH, куда и приходят гистоны. Иногда даже с этого конца геля авторы использовали фитили из смоченной щелочью фильтровальной бумаги.

Электрофорез во втором направлении проводили по методу Лэммли, в пластине размером $20 \times 16 \times 0,15$ см, используя вогнутый экспоненциальный градиент ПААГ (10—30%). Для того чтобы осуществить непосредственный контакт цилиндрика геля первого направления с торцом геля второго направления, при заливке последнего стеклянную форму наращивали резиновым кольцом и смесь мономеров заливали до уровня на 5 мм выше верхних краев стеклянных пластинок формы. После полимеризации кольцо снимали и гель обрезали вровень с краями стекол. Цилиндрик геля в этом случае можно не заливать агарозой, а просто прижать к торцу пластины, уложив на него стеклянную палочку, которую через 30 мин после начала электрофореза можно снять. Электрофорез начинали при силе тока 30 мА, а далее вели в течение 18 ч при 11 мА. Белки фиксировали в геле 10%-ным раствором CH_3COOH в 40%-ном этаноле; радиоактивные пятна регистрировали флюорографически.

Однако Уиллард и соавторы утверждают, что полного растворения основных белков (из гепатомы Новикова) не удастся добиться с помощью мочевины, NP-40, умеренных концентраций ДДС-Na, а также с помощью цетавлона и ряда других детергентов катионной природы. Решить проблему растворения и фракционирования основных белков в системе формирующегося градиента pH удалось путем использования в качестве детергента 0,5%-ного раствора дипальмитоил-L- α -фосфатидилхолина в сочетании с 9,5 М мочевиной [Willard et al., 1979].

РАСШИФРОВКА КАРТИН ДВУМЕРНОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ПО МЕТОДУ О'ФАРРЕЛЛА

Как уже упоминалось, в результате такого фракционирования получается сложная картина, насчитывающая иной раз более тысячи пятен. Она проявляется обычными методами — окрашиванием красителем СВВ R-250 или (в случае радиоактивных белков) автордио- и флюорографией. После этого возникает нелегкая задача идентификации каждого пятна и сопоставления расположения пятен в различных опытах с учетом неизбежных отличий, вытекающих из невозможности абсолютно точного воспроизведения условий разделения, особенно при электрофорезе в формирующемся градиенте pH. Для решения этой задачи необходимо ввести какие-то системы отсчета, более надежные, чем простое измерение координат пятен.

Прежде чем описать такие системы, упомянем еще об одном способе регистрации самих пятен — с помощью флюоресцентного красителя *флюоресцамина*. Такой способ был предложен недавно [Jackowski, Liew, 1980]. Пластины второго направления фиксировали в течение ночи в растворе, содержащем 10% CH_3COOH и 50% метанола, одновременно вымывая из нее амфолины, затем споласкивали 7%-ной CH_3COOH и помещали на

1 ч в диметилсульфоксид (ДМСО). После этого пластину переносили в 0,04 М раствор борной кислоты в ДМСО, титрованный до рН 10 добавлением 0,01 М NaOH. Щелочная среда благоприятствует реакции присоединения флюоресцамина по аминок группам белков [Остерман, 1981]. Через 2 ч добавляли равный объем раствора флюоресцамина в ДМСО (0,5 мг/мл) и встряхивали в течение 8 ч. Пятна белков становятся заметными уже через 2 ч. Их фотографируют, освещая пластину геля относительно длинноволновым УФ-светом.

Теперь обратимся к способам идентификации пятен, для чего в столь сложных случаях естественно было бы опираться на какую-то надежную систему белков-маркеров. Такая система была недавно предложена [Anderson, Nickman, 1979]. Авторы брали какой-либо хорошо изученный белок (например, гемоглобин или креатинфосфокиназу), растворяли его до концентрации 5 мг/мл в 8 М мочеvine и выдерживали аликвоты этого раствора при 95° в течение 2, 4, 8, 10, 15, 30, 45, 60 и 90 мин. В зависимости от продолжительности такой инкубации происходило все более значительное разложение мочеvine и все более полное карбамоилирование белка. Присоединение каждого остатка карбаминовой кислоты по аминок группе лизина или аргинина уменьшает число положительно заряженных групп в белке на единицу, и соответственно изменяется изоэлектрическая точка белка. Смесь обработанных таким образом аликвот маркерного белка при внесении ее одновременно с препаратом в двумерную систему фракционирования по О'Фарреллу дает в геле второго направления цепочку пятен, лежащих на одном горизонтальном уровне (очень малое приращение молекулярной массы маркера за счет карбамоилирования практически не заметно). Эта цепочка перекрывает широкий диапазон изменения pI . Используя в разных опытах одну и ту же маркировочную смесь, можно сравнивать между собой расположения пятен исследуемых белков, сопоставляя их по положению с близлежащими пятнами цепочки. Собственно говоря маркировка, или «привязка», здесь производится только по значениям pI .

В другой недавней работе была предложена система маркерных белков и для разделения во втором направлении — по размерам. В качестве такой системы авторы (в их числе и Н. Андерсон) рекомендуют использовать всю, очень стабильную совокупность белков сердца крысы. Подробно описана воспроизводимая процедура получения соответствующего гомогената. Его подмешивают к агарозе, которой заливают цилиндр геля первого направления при фиксации его по торцу пластины второго направления. Равномерно распределенные по всей длине цилиндрика, белки сердца после электрофореза во втором направлении образуют на пластине ряд параллельных полос. 80 характерных полос этого набора пронумерованы от нижнего до верхнего края пластины. Они перекрывают широкий диапазон молекулярных масс, так что с ними можно соотносить положе-

ния пятен после фракционирования сложных смесей исследуемых белков. Для 12 наиболее интенсивных полос набора определены молекулярные массы, лежащие в интервале 15—220 тыс. дальтон [Giometti et al., 1980].

Недавно сообщалось, что в Аргоннской национальной лаборатории (США) Н. Г. и Н. Л. Андерсон, автоматизировав метод О'Фаррелла так, что в день фракционируется более 100 препаратов, начали картирование всех белков и белковых субъединиц человека, число которых достигает 50 тысяч. Значение такого рода атласа для целей диагностики и лечения многих заболеваний, в частности злокачественных трансформаций тканей, трудно переоценить [Bishop, 1979b].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЭФ ВО ВТОРОМ НАПРАВЛЕНИИ

В этом случае общий подход остается тем же, что и раньше: в одном направлении белки фракционируют по размерам методом электрофореза в присутствии ДДС-На, а в другом — по значениям pI методом ИЭФ, но последовательность применения этих двух методов меняется. Уже упоминалось, что ДДС-На, используемый для растворения белков, можно вытеснить из комплекса с ними избытком неионного детергента NP-40, однако речь шла о сравнительно небольших добавках ДДС-На. Можно ли добиться достаточно полного для целей последующего ИЭФ удаления ДДС-На с белка, прошедшего жесткую обработку высокой концентрацией ДДС-На и β -маркаптоэтанола при 100° , как это предусмотрено в соответствующих методах электрофореза? Оказывается, можно.

Данно показал, что при проведении ИЭФ в геле, содержащем 8 М мочевины, ДДС-На постепенно снимается с белка и под действием электрического поля быстро уходит к аноду [Danpo, 1977]. Освободившийся белок может нормально фокусироваться в соответствии с характерным для него значением pI . Он проводил разделение окрашенных флюоресцамином белком в цилиндрическом геле первого направления по классической схеме электрофореза в присутствии ДДС-На [Остерман, 1981], затем вырезал окрашенные белковые зоны и встряхивал их в течение 15 мин при комнатной температуре в 8 М растворе мочевины с 2% амфолинов диапазона pH 3,5—10 (для зон толщиной менее 2 мм эту операцию можно опустить). Во втором направлении Данно проводил ИЭФ в трубке размером $10 \times 0,5$ см с 5%-ным ПААГ, полимеризованным в 8 М растворе мочевины, содержащем 2% амфолинов для диапазона pH 3,5—10. На торец геля в трубке он клал кусочек геля, содержащий белковую зону первого направления, заливал его тем же раствором, но с добавлением 5% сахарозы, а затем наслаивал анолит, в качестве которого использовал 1,7%-ный раствор H_3PO_4 . Анод, естественно, располагался над препаратом. После включения напряжения ДДС-На постепенно снимался и уходил вверх к аноду, а осво-

бодившиеся от него белки вступали в гель трубки, мигрировали вдоль градиента рН в сторону катода и фокусировались.

Годом позже аналогичный подход был использован для сопоставления генетических вариантов одного и того же белка [Singer et al., 1978]. Авторы интересовали мутационные замены одной аминокислоты, что могло приводить к изменению изоэлектрической точки белка при сохранении его молекулярной массы, поэтому в первом направлении для отбора из разных препаратов нужного белка использовали электрофорез в пластине ПААГ, содержащего ДДС-Na. Его вели под контролем данзилированного препарата, мигрирующего в отдельном треке. На уровне полосы обследуемого белка в этом треке вырезали горизонтально расположенную полоску геля поперек всей пластины первого направления. Ее и использовали далее в качестве исходного препарата для ИЭФ в пластине второго направления. В этой пластине полимеризовали 4%-ный ПААГ, содержащий, как обычно, 6 М мочевины, 2% NP-40 и 2% амфолинов. Ее устанавливали горизонтально в прибор «Мультифор» и на открытую поверхность со стороны анода накладывали полоску, вырезанную из геля первого направления, без какой-либо ее предварительной промывки. Для улучшения контакта и во избежание сдвига самой полоски к аноду (ведь она импрегнирована ДДС-Na) ее прижимали полоской стекла. Затем накладывали электроды, включали напряжение и приступали к фокусированию, как описано выше. Полоска геля первого направления здесь играла ту же роль, что и кусочки фильтровальной бумаги, смоченные раствором препаратов, при горизонтальном ИЭФ. До 90% белкового материала переходило в гель второго направления и фокусировалось в нем, а ДДС-Na отделялся и уходил к аноду. По положению сфокусированных полос белка на градиенте рН судили об изменениях рI в результате мутаций.

Такую же последовательность разделений использовали для двумерного фракционирования сложной смеси белков фибробластов почки хомячка [Tuszynski et al., 1979]. Белки экстрагировали в присутствии 2% ДДС-Na и фракционировали в первом направлении на пластине толщиной 1,5 мм классическим методом Лэммли с использованием градиента концентрации ПААГ (7—13%). Исходный материал для ИЭФ на втором этапе разделения на этот раз поставляла полоска геля, вырезанная продольно вдоль поля, т. е. один из треков пластины первого направления. Фокусирование, как и в предыдущем случае, проводили в приборе «Мультифор» на горизонтальной пластине 4,5%-ного ПААГ в присутствии 8,5 М мочевины и 2,5% NP-40, но в более узком диапазоне рН (5—7). По-видимому, для более быстрого фракционирования кислых белков авторы накладывали полоску геля первого направления на пластину со стороны катода. Кроме того, равномерность перехода белков из полоски в пластину могла пострадать от того, что концентрация ПААГ менялась от 7 до 13% вдоль полоски. Из-за этих двух обстоя-

тельств авторы ввели этап промежуточного электрофореза, в ходе которого белки отделялись от ДДС-На и переходили в 4,5%-ный ПААГ. Полоску трека первого направления зажимали в форму и полимеризовали над ней небольшой слой 4,5%-ного ПААГ с буфером формирующего геля системы Лэммли. Анод помещали внизу, под слоем; в качестве катодного буфера использовали Трис-глициновую смесь системы Лэммли. Над полоской геля первого направления наносили смесь двух красителей — бромфенолового синего и пиронина. При включении напряжения ДДС-На снимался с белков и уходил вместе с розовым фронтом пиронина к аноду. Белки из градиентного геля переходили в 4,5%-ный ПААГ в непосредственном соседстве с полосой бромфенолового синего. Ориентируясь по ней, из геля вырезали новую полоску и уже ее использовали в качестве исходного препарата для ИЭФ.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ ПЕРПЕНДИКУЛЯРНО ГРАДИЕНТУ pH

В заключение следует упомянуть о таком способе анализа белков, когда в первом направлении пластины геля ведут фокусирование одних только амфолитов, т. е. формирование градиента pH. Затем в такой пластине проводят электрофорез белков в перпендикулярном направлении. Таким способом можно подобрать оптимальное значение pH для электрофоретического разделения смеси белков или провести анализ изменения подвижности данного белка в геле в зависимости от pH. Препараты для разделения во втором направлении можно наносить отдельно, и тогда миграция будет идти в параллельных треках при различных, изменяющихся от трека к треку значениях pH. Исходный препарат можно нанести и одной полоской поперек всего градиента pH. В этом случае будут получены кривые сигмоидного вида, содержащие информацию того же типа, что и кривые титрования белков. В частности, по ним можно обнаружить различия в аминокислотном составе различных вариантов одного белка [Gianazza et al., 1980].

Глава 4

ПРЕПАРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ИЭФ

ИЭФ В СЛОЕ ГРАНУЛИРОВАННОГО ГЕЛЯ

Этот способ препаративного ИЭФ в настоящее время вытесняет широко распространенное ранее использование градиента плотности раствора сахарозы. Его преимущества — простота, высокая емкость и относительная нечувствительность к выпаде-

нию некоторых компонентов белковой смеси в осадок вблизи изоэлектрической точки. Кроме того, открытый доступ к поверхности фокусирующей среды позволяет описанным ниже способом снимать «реплики» расположения белковых зон для контроля за ходом фракционирования и локализации белков по его окончании. Простой метод элюции белков после извлечения соответствующих участков геля устраняет неизбежное для градиентов сахарозы разбавление, а иногда и смешивание белковых зон.

Отличительная особенность метода состоит в том, что ИЭФ белков происходит в водном растворе амфолитов, находящемся между гранулами набухшего сефадекса или другого инертного гидрофильного и гранулированного геля. Назначение геля состоит в подавлении возникновения конвекционных токов в жидкости. Вместе с тем, он достаточно мелкопорист для того, чтобы внутренний объем гранул оставался недоступным для белков. Относительно толстый, но ровный и открытый слой такого гранулированного геля располагается горизонтально. ИЭФ можно производить с помощью приборов для электрофореза в горизонтальных пластинах, например типа «Мультифор».

Приготовление рабочего слоя геля

Эта операция сводится к смешиванию сухого сефадекса G-75 «Superfine» с 2%-ным раствором амфолитов нужного диапазона рН. Для очистки определенного белка удобно воспользоваться амфолитами с узким диапазоном рН, если, конечно, значение рI для этого белка уже известно. Это позволяет оттеснить посторонние белки на концы слоя геля, а также увеличить его загрузку. Продажные препараты сефадекса содержат водорастворимые ионогенные примеси, могущие заметно нарушить нормальный ход формирования градиента рН, поэтому сефадекс надо предварительно тщательно промыть водой. Порцию сухого сефадекса высыпают с перемешиванием в 25 объемов воды и после 10-минутного набухания суспензию выливают на стеклянный фильтр с размерами пор в интервале 20—40 мкм. Кашицу сефадекса без суспендирования промывают на фильтре еще 5-кратным по сравнению с указанным количеством воды (эта операция занимает около 5 ч), а затем обезвоживают, пропуская несколько порций абсолютного этанола. Гель заметно сжимается. Затем его сушат в течение ночи в вакууме. Важность операции отмывки сефадекса иллюстрирует рис. 15.

Фирма «LKB» предлагает для ИЭФ специально промытый сефадекс под названием «Ultrodex»; им можно пользоваться без дополнительной промывки. Аналогичный продукт фирмы «Pharmacia» носит наименование «Sephadex IEF». Фирма «Bio-Rad» для этой же цели предлагает хорошо очищенный гранулированный гель на основе полиакриламида с пониженным содержанием остатков акриловой кислоты (эндосмос!) под названием «Bio-Lyte Electrofocusing gel».

Навеску промытого порошка сефадекса (или одного из названных фирменных гелей) медленно, с перемешиванием высыпают в стакан с 2%-ным раствором амфолитов с таким расчетом, чтобы получить 4%-ную суспензию, считая по отношению сухого веса сефадекса к конечному объему смеси. Не следует выливать раствор амфолинов на сухой гель — это приведет к образованию комков. Суспензию тщательно, но осторожно, чтобы не измельчать гранулы, перемешивают и, не дожидаясь полного набухания сефадекса, выливают на специальный поднос для формирования слоя гранулированного геля. Установленный строго горизонтально, поднос представляет собой прямоугольную стеклянную пластинку, соответствующую размерам охлаждающего столика прибора и ограниченную рамкой из силиконовой резины. 70—100 мл суспензии заливают таким образом, чтобы полужидкий ровный слой имел толщину 3—4 мм. Затем гель подсушивают до такой консистенции, когда на поверхности геля уже не видно влаги, но в его толще еще не возникают микротрещины. Это — довольно деликатная операция, и фирма «LKB» рекомендует контролировать ее ход по весу геля. Предварительно взвесив пустой поднос, можно следить за уменьшением веса геля в ходе подсушивания и прекратить его, когда содержание влаги уменьшится на 39—40%. Само подсушивание фирма рекомендует осуществлять с помощью вентилятора, установленного на высоте 70 см над пластиной, без подогрева воздуха. К моменту окончания подсушивания поверхность геля должна оставаться гладкой, а при наклоне в 45° он не должен сползать. Вся операция занимает около 2 ч.

Оптимальную степень высыхания суспензии другой концентрации можно определить опытным путем. Для этого следует провести предварительно подсушивание замоченного в воде сефадекса до появления первых видимых трещин на его поверхности, путем взвешивания определить потерю воды, отвечающую этому моменту, и при подготовке рабочего геля сушить его до

тех пор, пока потеря воды не составит 75% от определенного таким образом количества.

Фирма «Bio-Rad» для своих гелей рекомендует более простой способ сушки. По концам подноса на гель накладывают фитили из нескольких слоев фильтровальной бумаги и сменяют их до тех пор, пока

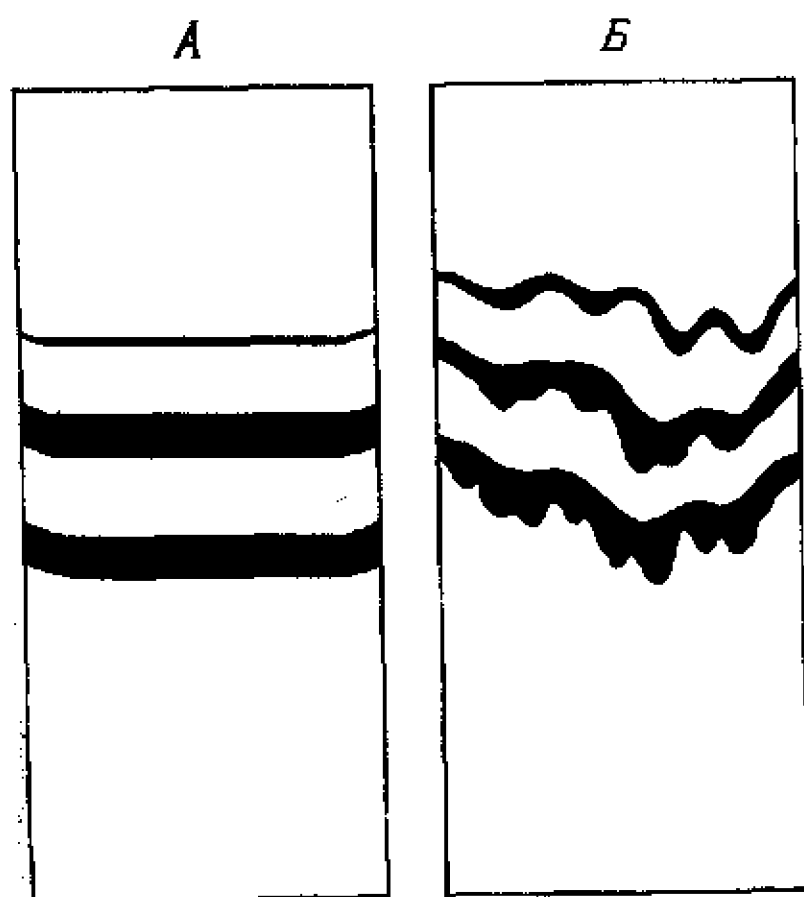


Рис. 15. Влияние ионогенных примесей в сефадексе на картину препаративного фракционирования белков

А — промытый сефадекс; Б — продажный препарат без промывки

поверхность геля не будет казаться сухой. Фирма «РПАПАСА» советует замочить 15 г сефадекса IEF в 225 мл воды, добавить 12 мл 40%-ного раствора фармалитов, деаэрировать эту густую суспензию, залить ею рамку для геля, разровнять поверхность, а затем, закрыв горлышко флакона марлей, подсыпать из него сухой гель равномерно на поверхность слоя до тех пор, пока не будет достигнута консистенция, сохраняющаяся без сдвига при наклоне пластинки на 45°.

Впрочем, авторы одной из недавних работ обходились без таких ухищрений. Они суспендировали 8 г сефадекса G-75 «Superfine» в 100 мл смеси раствора амфолинов и белкового препарата, перемешивали в течение нескольких минут, заливали эту почти 8%-ную суспензию на поднос в рамку и без дальнейшего подсушивания приступали к ИЭФ в приборе «Мультифор» [Legraverend, Glazer, 1980].

Внесение препарата

Для препаративного ИЭФ препарат вносят либо во весь объем геля, растворяя белки в смеси амфолинов до засыпки сефадекса, либо в виде полоски на всю ширину слоя в определенном его месте. Последнюю операцию можно осуществлять как до формирования градиента рН в геле, так и после него — в зависимости от лабильности белков. Для внесения препарата в толщу геля до самого его дна вдавливают узкую прямоугольную стальную рамку с острыми краями вместимостью 4—5 мл, перекрывающую всю ширину геля. Из нее шпателем выскребают сефадекс, смешивают его с раствором препарата и амфолинов (не более 3 мл) и возвращают эту смесь на прежнее место (рис. 16). Затем рамку вынимают и дают краям области нанесения сравняться за счет гидростатических сил с остальной массой геля. Если препарат содержит много соли, ее следует удалить диализом.

Электрический режим ИЭФ

Поднос с гелем устанавливают на охлаждающий столик прибора, обеспечивая надежный контакт между ними, как обычно, с помощью слоя раствора детергента. По коротким сторонам подноса на гель накладывают в три слоя полоски смоченной электролитами фильтровальной бумаги или специальные фитили (если ими комплектуется прибор) и прижимают их электродами той или иной конструкции.

Для 100 мл исходной суспензии сефадекса в приборе «Мультифор» фирма «LKB» рекомендует использовать режим постоянной мощности (около 8 Вт) при температуре охлаждающей жидкости 10°. Этому отвечает начальный режим с напряжением 350—400 В при силе тока 20—23 мА для диапазонов рН 2,5—4,5 и 7—10 — амфолины этих диапазонов отличаются повышенной

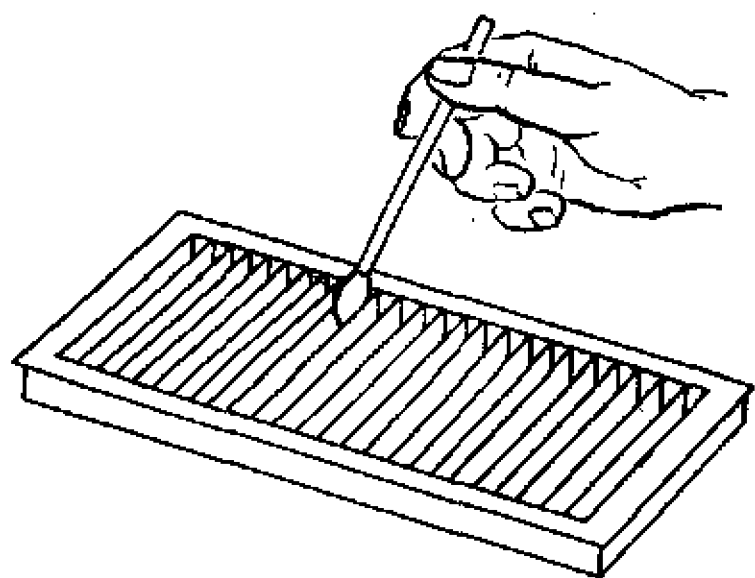
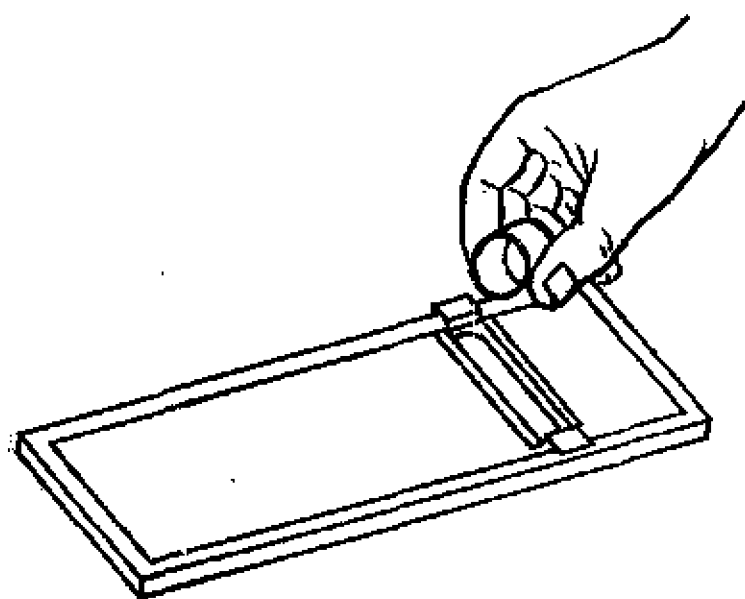


Рис. 16. Внесение препарата в слой сефадекса для препаративного ИЭФ

Рис. 17. Извлечение белковой полосы вместе с сефадексом после окончания ИЭФ

электропроводностью. Для диапазонов вблизи нейтрального значения рН начальное напряжение можно выбирать в пределах 500—650 В при силе тока 12—16 мА. К концу формирования градиента рН ток ослабляется примерно вдвое при соответствующем увеличении напряжения (постоянная мощность). В таком режиме процесс ИЭФ белков занимает 14—16 ч. Фирма «Pharmacia» на своем приборе FBE-3000 рекомендует проводить ИЭФ в слое гранулированного геля размером $20 \times 20 \times 0,5$ см при мощности 30—60 Вт. При этом фракционирование белков заканчивается за 4—6 ч. Соображения по поводу выбора диапазона рН и концентрации амфолитов, допустимого содержания солей и т. д. остаются теми же, что при аналитическом ИЭФ в ПААГ и гелях агарозы.

Обнаружение и элюция белков

Для этих целей с поверхности геля делают отпечаток («реплику»), фиксирующий положение сфокусированных белковых зон. Лист фильтровальной бумаги, например «Whatmann 1MM», вырезают по размерам геля. Сняв электроды и полоски бумаги под ними, накладывают лист фильтровальной бумаги на гель, начиная с одного конца, так чтобы избежать задержания воздуха между бумагой и поверхностью геля. В течение 2 мин дают бумаге впитать в себя жидкость из слоя геля. Вместе с раствором амфолитов из зон своего фокусирования на бумагу переходят в небольшом количестве и белки. Бумагу осторожно снимают и высушивают при $110-120^\circ$ в течение 10—15 мин, а затем промывают трижды по 15 мин в 10%-ной ТХУ. Эта операция фиксирует белки в тех местах реплики, которые находились над сфокусированными зонами в геле. Наконец, белки на бумаге окрашивают 0,2%-ным раствором СВВ R-250 в смеси, содержащей 10% CH_3COOH и 50% метанола. Отмывку фона производят в том же растворе без красителя, с несколькими его сме-

нами. Для окраски бумажной реплики можно использовать специфические красители, позволяющие выявить определенные белки. С той же целью используют ферментативные, иммунохимические и иные специальные реакции, а также автордиографию или флюорографию — для радиоактивно меченных белков.

Ввиду того, что фиксация белков в геле сефадекса не производится, во избежание диффузии белков немедленно после снятия реплики в гель погружают «фракционирующую сетку». Последняя представляет собой рамку немного меньшего размера, чем гель, в которой параллельно ее коротким сторонам и перпендикулярно плоскости рамки на равных расстояниях друг от друга закреплены 30 тонких, выступающих вниз металлических пластинок. При вдавливании в слой сефадекса до самого его дна пластинки рамки разделяют гель в направлении фракционирования белков на 30 изолированных секций. В каждой из них с помощью торцевого электрода можно измерить рН и по 30 точкам построить график истинного градиента рН вдоль геля. Путем сопоставления с окрашенными полосами на реплике легко установить, в какие секции попали сфокусированные белковые зоны. Из этих секций сефадекс вместе с белками извлекают с помощью шпателя (рис. 17). Аналогичная по своему назначению рамка фирмы «Pharmacia» снабжена прорезями, в которые разделительные пластинки можно устанавливать по выбору экспериментатора в соответствии с расположением и шириной белковых зон, обнаруженных на окрашенной реплике.

Перед извлечением сефадекса подготавливают достаточное число колонок объемом 5—10 мл. Можно, например, воспользоваться цилиндрами шприцов, заткнув их наконечники стеклянной ватой. Сефадекс из каждой отобранной секции шпателем переносят в отдельную колонку, суспендируют в буфере, дают осесть гелю, а затем элюируют белки примерно двумя объемами буфера по отношению к объему осевшего сефадекса. Поскольку белки не входят внутрь гранул сефадекса, элюция получается практически полной.

Белки от амфолитов в элюате можно отделить диализом, осаждением сульфатом аммония или гель-фильтрацией на сефадексе G-50. При этом в раствор рекомендуется ввести до 0,5 М NaCl для уменьшения электростатических взаимодействий между белками и амфолитами. Полное освобождение от амфолитов путем обычного диализа требует длительного времени (около 32 ч). Его можно значительно сократить, если есть возможность воспользоваться диализом в «биофибрах» или ультрадиализом под давлением в ячейках типа «Amicon». Если очищенные белки выдерживают осаждение сульфатом аммония, то этот способ очистки следует предпочесть как более быстрый. Амфолиты не выпадают в осадок даже из насыщенного раствора сульфата аммония. Для полного удаления амфолитов осадок белка следует трижды промыть таким же раствором сульфата аммония и лишь после этого растворять в буфере. Гель-фильтра-

ция, как обычно, занимает немного времени, но требует определенной подготовки.

Кроме очевидного удобства внесения препарата (в любой точке градиента рН), обнаружения и элюции белков, что обусловлено горизонтальным расположением и открытой поверхностью геля, подчеркнем относительную нечувствительность рассматриваемого метода к возможности выпадения в осадок некоторых белков вблизи их изоэлектрической точки. В описанной системе эти осадки будут уходить на дно слоя геля, освобождая его сечение для свободного протекания тока и миграции других белков. При извлечении сефадекса из секции осадок можно собрать вместе с гелем, перенести в колонку и в ходе элюции снова растворить, используя для этого подходящий буфер или солевой раствор. Возможность примириться с выпадением осадков особенно ценна на ранних стадиях очистки, когда очищаемый белок может составлять лишь малую долю всей белковой смеси. Допуская выпадение в осадок балластных белков, можно значительно увеличить загрузку геля и повысить выход нужного белка. Практика показывает, что для узких диапазонов рН загрузку гранулированного геля при ИЭФ можно довести в случае одного основного белка до 2—4 мг на 1 мл объема геля, а для смеси белков — до 5—10 мг/мл. При объеме геля в 80 мл это составляет внушительную величину общей загрузки — до 800 мг белковой смеси.

Препаративное ИЭФ в гранулированном геле сефадекса получило в последние годы широкое распространение для очистки самых разнообразных белков. В качестве примеров назовем изящную работу Бойда и Спелсберг, где белки-рецепторы прогестерона яйцевода очищали методом ИЭФ в виде комплекса с радиоактивно меченным прогестероном [Boyd, Spelsberg, 1979], и уже упомянутую работу Леграверенда и Глазер, в которой при очистке негистонового белка хроматина печени крысы во избежание его агрегации и окисления ИЭФ проводили в присутствии 5 М мочевины и 1 мМ β -меркаптоэтанола.

ИЭФ белков с препаративными целями можно осуществить и в агарозе. На пластинке 0,8%-ного геля агарозы толщиной 2,5 мм в приборе «Мультифор» удавалось фракционировать методом ИЭФ до 1 г белков плазмы [Charuis-Cellier, Agnaud, 1981]. Для нанесения такого количества белка на гель диализованный препарат плазмы концентрировали ультрафильтрацией до содержания белка 200 мг/мл. 5 мл такого концентрата смешивали при 30° с легкоплавкой агарозой, заливали в виде пластинки толщиной 2 мм и накладывали ее с одного конца на предфокусированный рабочий гель агарозы. Электрофокусирование при мощности 15 Вт занимало 8 ч. Авторы утверждают, что воспроизводимость картины ИЭФ в агарозе заметно лучше, чем на сефадексе. Однако извлечь белки из агарозы значительно сложнее, чем из слоя сефадекса.

ИЭФ В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ РАСТВОРА САХАРОЗЫ

Этот метод был отработан и внедрен в исследовательскую практику первым. Колонки для ИЭФ в градиенте плотности сахарозы были выпущены в продажу фирмой «ЛКВ» еще десятилетие тому назад. Они нашли широкое применение и до сих пор выпускаются в неизменном виде, хотя создается впечатление, что препаративное ИЭФ в гранулированном геле благодаря рассмотренным выше преимуществам вытесняет ИЭФ в градиенте плотности сахарозы.

Тем не менее, ввиду широкой распространенности метода ИЭФ в жидкостных колонках следует рассмотреть его особенности. Процесс ИЭФ белков здесь протекает в растворе амфолитов без носителя. Опасность конвекционного перемешивания слоев жидкости блокируется созданием по высоте колонки достаточно крутого линейного градиента плотности раствора сахарозы, которая не мешает формированию градиента рН и фокусированию белков. Колонку заполняют с помощью перистальтического насоса из смесителя градиента того же типа, что используется для приготовления линейных градиентов плотности растворов сахарозы для ультрацентрифугирования [Остерман, 1981]. На дно колонки амфолиты поступают в 50%-ном растворе сахарозы, к ее верхнему концу концентрация сахарозы снижается до 5%.

Конструкция колонки

На рис. 18 показана схема колонки фирмы «ЛКВ», изготовленной из стекла. Раствор амфолитов и сахарозы заполняет кольцевую камеру между наружной охлаждающей рубашкой и внутренним цилиндром, где тоже циркулирует охлаждающая вода. По оси внутреннего цилиндра от воды отделена еще одна центральная полость, через которую проходит стержень, несущий на себе платиновую проволочку нижнего электрода. Во время фокусирования эта полость заполнена раствором электролита. После окончания ИЭФ при опорожнении колонки через расположенное внизу отверстие электролит запирают в центральной полости. Для этой цели служит клапан, который в соответствующий момент времени можно поднять с помощью того же центрального стержня. Второй электрод в виде платинового кольца находится в верхней части рабочей камеры. Клеммы обоих электродов выведены на пластмассовую головку колонки. Заполнять колонку можно как через центральную полость, так и подавая жидкость непосредственно в кольцевую рабочую камеру. Для этого в верхней части колонки предусмотрены соответствующие трубки. Фирма «ЛКВ» выпускает два типа колонок описанной конструкции с рабочими объемами 110 и 440 мл.

Заполнение колонки

Заполнение колонки производят в два этапа. Сначала при открытом клапане через центральную трубку на дно колонки подают нижний электролит, в котором растворена сахароза до концентрации 60%. Объем электролита таков, что его уровень оказывается на этом этапе заметно выше нижнего края трубки. Затем из смесителя градиента непосредственно рабочую камеру заполняют раствором амфолитов в указанном градиенте концентрации сахарозы. При этом нижний электролит частично вытесняется обратно в центральную трубку, но так, что при целиком заполненной рабочей камере конец трубки все еще остается погруженным в электролит. Наконец, в область расположения верхнего электрода наслаивают верхний электролит, не содержащий сахарозы. В качестве электролитов используют 0,25 М NaOH и 0,15 М H_3PO_4 .

Внесение препарата

Есть три возможности внесения раствора белкового препарата в колонку.

1. Проще всего смешать препарат с одной или обеими жидкостями в смесителе градиента, соответственно добавив в них амфолитов и сахарозы. Этот метод особенно удобен, если объем препарата велик, например на первых стадиях очистки белка.

2. Препарат можно внести в виде узкого слоя в любое место по высоте колонки, например туда, где ожидается фокусирование зоны очищаемого белка. Для того чтобы при этом не слишком сильно нарушался градиент плотности, поступают следующим образом. Колонку заполняют, как обычно, из смесителя градиента, но только до намеченного уровня. Затем жидкость из смесителя подают в три пробирки, внося в них последовательно 0,5, 3 и 0,5 мл. В среднюю пробирку добавляют 0,5—1 мл белкового раствора, а затем постепенно добавляют концентрированный раствор сахарозы до тех пор, пока плотность смеси в пробирке снова станет промежуточной между плотностями растворов в первой и третьей пробирках — капля этой смеси при осторожном внесении должна опускаться на дно в третьей пробирке и оставаться на поверхности жидкости в первой пробирке. После

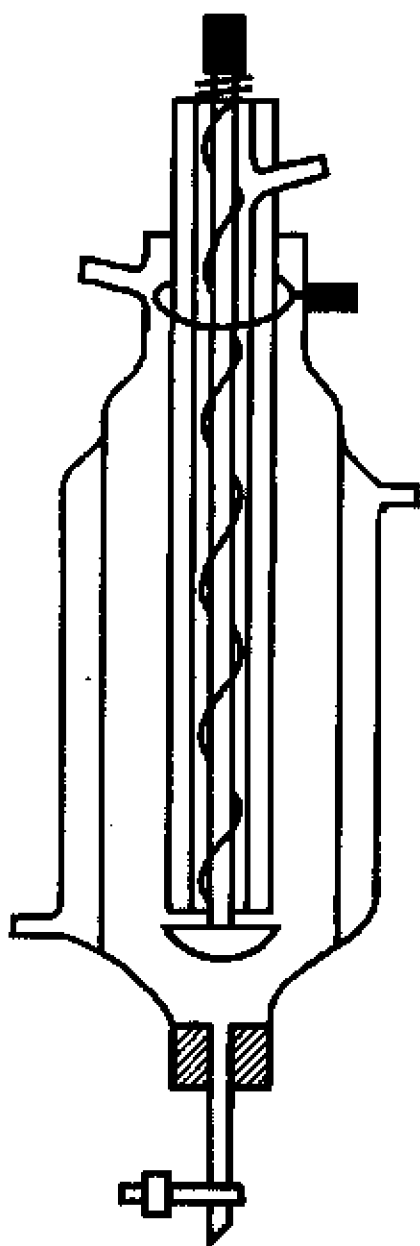


Рис. 18. Схема устройства колонки фирмы «LKB» для препаративного ИЭФ в жидкой среде с градиентом плотности сахарозы

этого содержимое второй пробирки наслаивают на поверхность уже внесенной части градиента в колонке и продолжают ее заполнение из смесителя градиента. Вносить жидкость в колонку следует очень осторожно, через гибкую трубочку, прилегающую своим концом к стенке камеры, со скоростью 1 или 4 мл/мин в зависимости от типа колонки.

3. Слой препарата можно внести в выбранную точку градиента рН после его установления в колонке под действием электрического поля. Для этого выключают напряжение и осторожно опускают тонкую трубочку до намеченного уровня. С помощью перистальтического насоса через нее отсасывают 4 мл жидкости из уже сформированного градиента и помещают их в три пробирки, как описано выше. Затем производят аналогичную операцию внесения препарата в среднюю пробирку и подбора плотности смеси. Не меняя положения трубочки в колонке, накачивают ранее извлеченный слой градиента с внесенным в него препаратом на прежнее место.

При использовании методов 2 и 3 белок быстрее достигает своего изoeлектрического положения, чем при внесении в весь объем колонки. Особенно это относится к методу 3, который следует предпочесть при фокусировании нестойких белков. Как и при других методах ИЭФ, содержание соли в белковом препарате желательно свести к минимуму. Для колонки объемом 110 мл максимально допустимое количество соли в препарате составляет 0,5 ммоль, для колонки объемом 440 мл — 1,5 ммоль. В случае необходимости для сохранения растворимости белка соль в растворе препарата можно путем диализа заменить на 1%-ный раствор глицина.

Рабочий режим ИЭФ

При температуре охлаждающей воды 4° фирма рекомендует не превышать электрической мощности в 15 Вт для колонок объемом 110 мл и 30 Вт — для колонок объемом 440 мл. Во избежание образования локальных точек перегрева рекомендуется также не превышать значений напряжения 1600 и 2000 В соответственно. В начале ИЭФ при указанных значениях мощности напряжение может быть заметно ниже. Например, для хорошо проводящих ток амфолинов диапазона рН 9—11 оно может составлять 1000 В, а для рН 2,5—4 — около 800 В. В ходе формирования градиента рН напряжение растет до указанных предельных значений, а далее его поддерживают неизменным. В этих условиях фокусирование белков заканчивается за 15—20 ч. Необходимую продолжительность ИЭФ следует установить экспериментально — по результатам фокусирования. Даже об окончании формирования градиента рН нельзя судить по кажущемуся прекращению падения тока, так как вблизи положения равновесия амфолины мигрируют очень медленно. Тем более это относится к белкам.

Опорожнение колонки

Эту операцию производят через нижнее, снабженное краном отверстие в следующей последовательности. Отключают напряжение и, подняв клапан, запирают электролит в центральной трубке. Во избежание подтекания его лучше из трубки отсосать. Из рабочего объема колонки сверху отсасывают верхний электродный буфер и до предела заполняют верхнюю часть колонки водой. Затем к отростку, ведущему в рабочую камеру, плотно присоединяют выходную трубку перистальтического насоса и открывают сливной кран. Жидкость из колонки будет вытекать только по мере подачи воды от перистальтического насоса в верхнюю часть камеры. Скорость этой подачи можно регулировать. Фирма рекомендует опорожнять колонку со скоростью 60—80 мл/ч. Элюат из колонки через денситометр направляют в коллектор фракций. Во фракциях измеряют рН (при температуре фокусирования!). Если ультрафиолетовое поглощение оказывается недостаточным, наличие белков во фракциях определяют в аликвотах с помощью окрашивания или других описанных выше методов обнаружения белков. Отобранные фракции объединяют и отделяют в них белки от амфолинов.

Специфические проблемы

Одна из них связана с самим градиентом плотности. Выполняя свою основную функцию подавления конвекции в жидкости, он, как это ни парадоксально, в определенной мере эту конвекцию и стимулирует. Для уменьшения опасности перемешивания слоев жидкости желательно обеспечить строгое постоянство ее температуры по всей высоте колонки. С этой целью стараются добиться неизменности электрического сопротивления амфолитов вдоль всего градиента рН. Между тем электрофоретическая подвижность любых ионов, в том числе и амфолитов, уменьшается с увеличением вязкости среды. Именно это происходит с амфолитами, оказавшимися в нижней части колонки, в среде плотного раствора сахарозы. В результате этого электрическое сопротивление и тепловыделение будут нарастать по направлению от верха к дну колонки и нижние слои жидкости, несмотря на охлаждение, будут нагреваться несколько сильнее, чем верхние, а это как раз и вызывает конвекцию.

Выбор полярности электродов

Иногда описанный эффект можно в определенной мере компенсировать правильным выбором полярности электродов. Ранее отмечалось, что электропроводность амфолитов, обеспечивающих область нейтральных значений рН, заметно ниже, чем у амфолитов кислой и щелочной областей градиента рН. В тех случаях, когда градиент перекрывает не весь возможный

диапазон значений рН, а сдвинут в кислую или щелочную область, имеет смысл так выбрать расположение электродов, чтобы экстремальные значения рН лежали в нижней части колонки. В этом случае повышенная электропроводность амфолитов, обеспечивающих эти значения рН, будет компенсировать снижение их подвижности вследствие повышенной вязкости среды. Так, если фокусирование предполагают вести в диапазоне рН 7—10, то имеет смысл внизу расположить катод, а для диапазона рН 3—7 нижний электрод лучше сделать анодом.

Здесь уместно напомнить об опасности возникновения слоя чистой воды и целесообразности использования смесей амфолитов разных диапазонов рН, а также о рациональном выборе электродных электролитов для обеспечения плавного характера перехода от рабочих значений градиента рН к электродам. Эти вопросы были подробно рассмотрены выше.

Выбор полярности электродов зависит не только от приведенных соображений, относящихся к проблеме конвекции. Он должен учитывать еще некоторые обстоятельства, например положение зоны очищаемого белка по высоте колонки. В процессе элюции, когда электрическое поле выключено, идет диффузионное и гидродинамическое (при истечении) размывание белковых зон, поэтому естественно выбрать полярность электродов таким образом, чтобы интересующая зона оказалась в нижней части колонки.

Опасность выпадения осадков

Есть еще одно, специфическое для данного метода обстоятельство — опасность выпадения белков в осадок вблизи их изоэлектрической точки. Вертикальное расположение колонки и жидкая среда придают этой опасности особое значение. Дело не в том, что выпавший в осадок белок может сильно повлиять на электропроводность окружающего его раствора амфолитов — для этого осадок должен быть слишком плотным. Опасно другое: белковые осадки могут постепенно оседать на дно колонки, нарушая плавность градиента рН и загрязняя лежащие ниже зоны. На ранних этапах очистки белков, когда их содержание в исходной смеси невелико, такая ситуация вполне реальна; именно она может оказаться решающей для выбора полярности электродов. Фокусирование нужных белков может пройти вполне успешно несмотря на образование осадков, если зона фокусирования окажется лежащей выше области осаждения. Правда, в этом случае во избежание загрязнения очищаемого белка частицами осадка элюировать колонку лучше не через нижний сливной канал, а через верхний отросток, используемый для ее заполнения. С этой целью концентрированный раствор сахарозы подают от насоса через сливной канал в нижнюю часть колонки.

Геометрия верхней части колонки и боковое расположение отростка не благоприятствуют хорошему отделению близлежащих зон. Фирма «LKB» в этом случае рекомендует другой, более эффективный, хотя и более сложный способ — вводить в рабочую камеру сверху через тот же отросток полиэтиленовую трубочку и отсасывать градиент слой за слоем, опуская кончик трубочки всякий раз на одинаковую глубину под уровень жидкости в камере. Для более полного сбора каждой фракции на нее предварительно можно наслоить немного воды, а кончик трубочки загнуть на 180° и расширить, придав ему форму маленькой воронки. Таким способом можно отсосать и слой выпавшего в осадок белка, если этот осадок не настолько плотный, чтобы опускаться на дно камеры.

Проблема растворимости

В последнем замечании содержится намек на то, что опасность выпадения осадка в изoeлектрической точке существует и для самих очищаемых ИЭФ белков. Это действительно так, что иногда заставляет принять особые меры по увеличению растворимости этих белков. Иной раз присутствие сахарозы неблагоприятно сказывается на растворимости белка. В этом случае следует построить градиент плотности путем добавления к раствору амфолитов глицерина (до 60%), этиленгликоля (до 75%) или сорбита (до 50%). Кстати, если фокусирование предполагается вести при $pH > 9$, то сахарозу вообще лучше заменить сорбитом. В щелочной области pH сахароза диссоциирует как слабая кислота и может нарушить характер градиента pH , образуемого амфолитами.

Иногда улучшения растворимости белка вблизи изoeлектрической точки можно добиться увеличением концентрации самих амфолитов до 3—4%. Наконец, в распоряжении экспериментатора всегда остается возможность испытать испытанный способ увеличения растворимости белков путем введения в жидкую среду солюбилизующих добавок. Разумеется, они должны иметь неионный характер или быть заведомо нейтральными цвиттерионами. В качестве таких добавок можно использовать мочевины или неионные детергенты, например Тритон X-100, NP-40 и Brij-35, а в качестве нейтрального цвиттериона можно взять глицин. О солюбилизующих добавках было достаточно подробно сказано в гл. 2. Здесь только отметим, что в присутствии сахарозы при 4° мочевины может частично кристаллизоваться из раствора. Это обстоятельство надо иметь в виду при выборе концентрации мочевины (не более 6 М) и температуры охлаждающей воды.

Рассмотрим теперь существенный для препаративных опытов вопрос о максимальной загрузке электрофокусирующих колонок фирмы «LKB». Предел допустимой загрузки белковой зоны зависит от растворимости очищаемого белка вблизи его изоэлектрической точки, от буферной емкости амфолитов в области фокусирования зоны и от способности градиента плотности поддерживать сфокусированную белковую зону в месте ее образования несмотря на локальное повышение плотности раствора за счет концентрирования в нем белка. Во всех этих аспектах условия для успешного фокусирования оказываются тем менее благоприятными, чем уже зона фокусирования белка, т. е. чем более крутой градиент рН используется для ИЭФ. Поэтому в интересах максимальной загрузки полезной зоны при препаративной очистке белка имеет смысл использовать пологие градиенты рН (т. е. узкие диапазоны рН), тем более что в этом случае балластные белки оттесняются дальше к аноду или катоду. Разумеется, для этого в предварительном аналитическом опыте надо определить значение pI очищаемого белка. Для ориентировки можно указать, что загрузка одной зоны в колонке объемом 110 мл может составлять 5—25 мг белка, а для колонок объемом 440 мл ее можно увеличить до 20—80 мг [Righetti, Drysdale, 1976]. Для смеси белков, состоящей из 10 основных компонентов, это означает, что на колонки «LKB» можно нанести до 250 и 800 мг исходного белкового препарата соответственно, т. е. примерно столько же, сколько при ИЭФ в горизонтальных пластинах гранулированного геля. Впрочем, в литературе встречаются сведения и о заметно больших загрузках — вплоть до нескольких граммов белка на колонку объемом 440 мл.

Получение амфолитов для узких диапазонов рН

Теперь уместно напомнить еще об одном применении колонок с градиентом плотности раствора сахарозы, где они оказываются вне конкуренции. Это — получение амфолитов для более узких диапазонов рН, чем те, на которые рассчитаны продажные препараты. Эта операция была описана в гл. 1. Отметим, что в данном случае следует не только увеличить исходную концентрацию амфолитов, но и уменьшить концентрацию сахарозы, например создать градиент ее концентрации 0—10%. При фракционировании амфолитов такой градиент будет оказывать достаточное противодействие конвекции жидкости, к тому же отпадает необходимость последующего отделения амфолитов от сахарозы, что сделать достаточно трудно. Отбор амфолитов, лежащих в очень узком диапазоне рН, для разделения белков с близкими значениями pI , можно производить вместе с самими белками. ИЭФ в этом случае проводят в два этапа. На пер-

вом, использующем амфолиты нормального диапазона рН, отделяются посторонние белки. Подлежащие дальнейшему фракционированию близко лежащие компоненты белковой смеси отбирают вместе с частью амфолитов, которые могут обеспечить узкий диапазон рН, например в 0,5 ед. При повторном ИЭФ в градиенте рН такого диапазона, растянутом на всю высоту колонки или длину геля, близкие по pI белки могут образовать отдельные зоны.

Колонки фирмы «ISCO»

В заключение упомянем о своеобразной конструкции колонок для ИЭФ в градиенте плотности раствора сахарозы, разработанной фирмой «ISCO» (модель 212). Конструкторы этой фирмы стремились предоставить экспериментатору возможность следить за миграцией белков в ходе их фокусирования путем периодического сканирования всего градиента при 280 нм. На самой рабочей колонке это сделать не удастся ввиду необходимости заключить ее в охлаждающую рубашку. Было найдено оригинальное, хотя и довольно сложное решение проблемы. Накачивая снизу в колонку плотный раствор сахарозы, ее содержимое, т. е. весь градиент рН, периодически поднимают в присоединенную сверху к колонке кварцевую трубку того же диаметра. При этом весь градиент последовательно проходит мимо облегающего эту трубку узла УФ-денситометра, для которого небольшой участок трубки играет роль цилиндрической кюветы. Затем весь столб жидкости возвращается обратно в колонку. Электрическое напряжение на рабочую колонку подается через расположенные по ее концам цилиндрические мембраны. На время сканирования напряжение выключается. Содержимое колонки элюируют в коллектор фракций также путем выдавливания градиента вверх. Объем колонки (охлаждаемой только снаружи) — 23 мл, а максимальная загрузка может составлять 10 мг белка. Все эти дорогостоящие усложнения не кажутся достаточно оправданными; судя по публикациям последних лет, колонки «ISCO» широкого распространения не получили.

В интересах экономии места и из-за наметившегося вытеснения колонок для препаративного ИЭФ гранулированными гелями не будем рассматривать примеры применения ИЭФ в градиентах плотности растворов сахарозы. Читатель найдет их во множестве в периодической литературе 70-х годов, а исчерпывающую библиографию по этому поводу — в ежегодном справочном издании фирмы «LKB» «Acta ampholinae».

ИЗОТАХОФОРЕЗ

Этот относительно новый метод фракционирования биологических молекул, в том числе и белков, предложен специалистами фирмы «LKB» более 10 лет назад. С тех пор фирма не прекращает усилий по пропаганде метода и рекламе разработанного специально для него прибора «Тахофор». Однако широкого распространения для фракционирования и исследования белков метод пока не получил. На то есть объективные причины; некоторые из них будут названы ниже. В связи с этим мы ограничимся кратким знакомством с принципом и особенностями метода изотахофореза в ожидании его дальнейшего развития.

Этот принцип проще всего понять, отталкиваясь от проведенного в предыдущей книге подробного рассмотрения процессов ступенчатого электрофореза [Остерман, 1981]. Вспомним поведение используемых там двух сильно отличающихся по электрофоретической подвижности анионов — хлора и глицина. Хлор в ходе электрофореза отходит к аноду, и вслед за ним из катодного резервуара движется отрицательно заряженный при щелочном рН ион глицина. Значение рН задается Трис-буфером. В любой ситуации, при любом рН ион глицина следует вплотную за ионом хлора. В формирующем теле при рН 6,8, когда электрофоретическая подвижность глицина мала, происходит перераспределение напряженности электрического поля таким образом, чтобы обеспечить миграцию ионов глицина с такой же скоростью, как и ионов хлора. Разрыва между ними быть не может — иначе бы не было тока. Перераспределение напряженности поля вдоль столбика геля при ступенчатом электрофорезе используется для сужения исходной полосы смеси белков. Существенно, что концентрация белков при этом настолько мала, что вклад их собственной ионной проводимости незначителен по сравнению с электропроводностью буфера. Белки мигрируют в электрическом поле, не зависящем от их присутствия. Ион глицина обгоняет самый быстрый из белков, и собственно фракционирование белковой смеси происходит в Трис-глициновом буфере с рН 8,8 — в поле неизменной напряженности.

При изотахофорезе белков их концентрация соизмерима с концентрацией быстро мигрирующего иона, вначале заполняющего весь объем геля. Электрофоретическая подвижность замыкающего иона, находящегося первоначально в верхнем электродном резервуаре, остается все время меньше, чем подвижность самого медленного из белков смеси. При включении электрического тока быстро мигрирующий ион буфера опять отходит к нижнему электроду, но теперь вплотную за ним следуют сами белки, выступающие в роли переносящих ток ионов.

Постепенно они выстраиваются в порядке убывания их электрофоретических подвижностей. Замыкает цепочку ион верхнего резервуара. В установившемся режиме вся эта цепь ионов движется вдоль геля с постоянной скоростью (отсюда и название — «изотахофорез»). Напряженность электрического поля ступенчато увеличивается при переходе от зоны одного иона к зоне следующего за ним другого пропорционально последовательному уменьшению электрофоретических подвижностей этих ионов. Это вытекает из условия равенства скоростей миграции всех ионов, поскольку скорость миграции определяется произведением электрофоретической подвижности иона на напряженность поля. Требование же равенства скоростей вытекает из очевидного условия непрерывности и постоянства электрического тока вдоль всего геля. Распределение напряженности по зонам миграции каждого из белковых ионов диктуется соотношением электрических сопротивлений этих зон, которые зависят от концентрации в них ионов. Эти концентрации устанавливаются под действием самого поля, за счет сужения или расширения каждой зоны в зависимости от того, в каком количестве соответствующий белковый ион представлен в исходной смеси белков. В процессе миграции вдоль геля эти зоны сохраняют неизменную ширину.

То обстоятельство, что впереди зоны любого из ионов движется зона с более низкой напряженностью электрического поля, а сзади — зона с повышенной напряженностью, приводит к установлению резких границ между белковыми зонами вопреки диффузии. Действительно, попавший в результате диффузии во впереди идущую зону ион ввиду более низкой напряженности поля в этой зоне замедлит движение и вернется в «свою» зону. Точно так же догонит эту зону ион, диффундировавший в идущую сзади зону повышенной напряженности.

Описанная сортировка белков смеси по зонам в соответствии с их электрофоретическими подвижностями практически бесполезна, так как белки двигаются вплотную друг за другом, что не позволяет им надежно разделиться. Однако в исходную белковую смесь можно добавить ионы небелковой природы, которые будут «вклиниваться» между зонами белков и разделять их друг от друга, — так называемые «спейсеры». Они могут быть низкомолекулярными, что позволит далее легко очистить от них белки. Например, при изотахофорезе белков сыворотки крови в нее добавляли следующие аминокислоты: аспарагин, глицин и β -аланин [Schafer-Nielsen et al., 1980]. Электрофоретические подвижности этих аминокислот не одинаковы, но лежат внутри диапазона подвижностей, характерных для белков сыворотки. При формировании движущейся цепочки зон ионов каждая из аминокислот вклинивается на соответствующее место, «раздвинув» две соседние белковые зоны. Теперь белки сыворотки разобьются на четыре отделенные друг от друга группы. Число спейсерных добавок можно увеличить,

а концентрацию каждой из них подобрать так, что весь исходный набор белков разобьется на несколько четко ограниченных полос, разделенных легко идентифицируемыми, заранее известными зонами спейсеров. В принципе можно так выбрать спейсеры, что в каждой белковой зоне будет мигрировать только один белок. Разделение белков в этом случае будет идеальным и произойдет очень быстро. Но как подобрать спейсеры, чтобы они встроились именно между белками или хотя бы между теми белками, которые надо разделить, если электрофоретические подвижности этих белков точно не известны? Практически приходится идти долгим путем подбора.

Фирма «LKB» рекомендует примешивать к исходному белковому препарату в качестве спейсеров амфолины. Отличие от ИЭФ здесь в том, что амфолины вносят не в объем геля или жидкости, в которых проводят электрофорез, а только в исходный препарат, причем в таком количестве, которого недостаточно для обеспечения проводимости по всему объему фракционирования. В отличие от ИЭФ, в этом случае зоны расположения амфолинов не перекрываются и сами они не разряжаются, не формируют градиента pH, а мигрируют в качестве ионов наряду с белками, встраиваясь между ними в цепочку зон с убывающей электрофоретической подвижностью. Все амфолины в этой системе несут заряд одного знака, но в зависимости от своих pI различаются по величине этого заряда, образуя тем самым широкий набор спейсеров с различными электрофоретическими подвижностями. При этом pH среды, в которой идет миграция, определяет буферный противоион.

В рассмотренном примере использования аминокислот в качестве спейсеров изотахофорез проводили в 6,4%-ном ПААГ. После окончания фракционирования (формирования четких зон) белки фиксировали и окрашивали в геле красителем СВВ G-250. В приборе «Тахофор» изотахофорез микроколичеств белковой смеси и амфолинов проводят в жидкости, заполняющей длинный (до 80 см), хорошо термостатированный тефлоновый капилляр диаметром 0,5 мм. Препарат вводят с помощью микрошприца. Благодаря низкой концентрации амфолинов и белков, а также большой длине капилляра рабочие напряжения в приборе достигают десятка тысяч и более вольт. Регистрацию белковых зон на выходе из капилляра осуществляют с помощью денситометра по УФ-поглощению при 280 нм. Зоны белков и амфолинов в этом приборе мигрируют быстро, и весь анализ белковой смеси обычно занимает менее часа. Однако главный недостаток метода остается в силе — заранее не известно, какие белки и в какой степени будут раздвинуты амфолинами. Концентрацию последних приходится брать низкой, чтобы не помешать проявлению проводимости за счет белков. Но смесь амфолинов многокомпонентна. Количество одной из аминокислот, внесенных в состав этой смеси, например как раз той, которая разобщает два близких по своей подвижности

белка, может оказаться столь малым, что обеспечить это разобщение не удастся. И наоборот — два легко разделяемых по своим подвижностям белка могут оказаться раздвинутыми излишне широко за счет сжатия всех остальных зон.

Создается впечатление, что для фракционирования белков метод изотахофореза если и привлекателен, то скорее всего не в сфере научных исследований, а как метод рутинного контроля за сохранением пропорций уже известной белковой смеси. Сюда относятся такие важнейшие сферы деятельности, как технологический контроль в пищевой промышленности или диагностика заболеваний по белковому составу физиологических жидкостей организма [Delmotte, 1977]. Немалые возможности открывает изотахофорез и для анализа смесей определенных низкомолекулярных веществ, например, в фармакологии — для контроля синтеза или очистки биологически активных пептидов, при изучении реакций метаболизма, а также в пищевой индустрии — для обнаружения примесей органических кислот и других ингредиентов в пищевых продуктах. Такого рода приложения выходят за рамки этой книги, поэтому изложенным выше мы ограничим свое знакомство с методом изотахофореза, по крайней мере до тех пор, пока он не продемонстрирует более убедительно свою пригодность для исследования белков и нуклеиновых кислот.

* * *

Когда писались эти строчки, трудно было предположить, что до такой демонстрации остается меньше времени, чем необходимо для подготовки рукописи к печати. Однако перед самой отправкой ее в типографию была опубликована исключительно красивая работа Г. И. Абелева и Э. Р. Каримовой, коренным образом меняющая ситуацию с изотахофорезом белков. Излагаем вкратце ее идею и даем ссылку на первоисточник [Абелев, Каримова, 1982].

В обычном варианте изотахофореза вся картина распределения компонентов движется вдоль пластинки. При попытке осуществить фракционирование из большого объема разбавленного препарата выясняется, что формирование последовательности узких белковых зон не успевает завершиться к моменту, когда граница лидирующего иона достигает конца пластинки. Авторам удалось остановить движение картины распределения относительно пластинки, сохранив сущность явления изотахофореза. Для этого они воспользовались «принципом относительности» движения, заставив всю жидкость, заполняющую сетку носителя, двигаться в обратном направлении с точно такой же скоростью, с какой мигрируют ионы обоих буферов и расположенные между ними белковые зоны, разделенные амфолинами. Таким образом картина распределения сохраняется неограниченно долго и белки из любого объема исходного препарата могут собираться в узкие зоны (практически для этого достаточно 4 ч).

Движение жидкости осуществляется за счет эндосмоса в пленке ацетилцеллюлозы, неожиданные особенности которого были обнаружены и использованы в этой работе. Самое замечательное здесь то, что равенство скоростей движения жидкости и миграции зон устанавливается автоматически. Экспериментатору не приходится заботиться об остановке картины распределения — она останавливается сама в результате «игры» сил, создаваемых электрическим полем. Для анализа распределения белков авторы использовали тонкие методы иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза и потому назвали свой метод «противоточным иммуноизотахофорезом», но, если этого достаточно, можно ограничиться применением обычных методов окрашивания или авторадиографии, описанных выше для ИЭФ.

ЛИТЕРАТУРА

- Абелев Г. И., Каримова Э. Р.— Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1982, 27, № 4, с. 69—75.
- Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981.
- Allen R. E., Masak K. C., McAllister P. K.— Anal. Biochem., 1980, 104, p. 494—498.
- Anderson N. L., Hickman B. J.— Ibid., 1979, 93, p. 312—320.
- Banga J. P., Anderton B. H., Roitt I. M.— Ibid., 1978, 89, p. 348—354.
- Bishop R.— Sci. Tools, 1979a, 26, p. 2—8.
- Bishop R.— Ibid., 1979b, 26, p. 70.
- Boyd A., Spelsberg T. C.— Biochemistry, 1979, 18, p. 3679—3690.
- Burnett D., Bradwell A. R., Ramsden D. B.— Sci. Tools, 1980, 27, p. 19—20.
- Caspers M. L., Posey Y., Brown R. K.— Anal. Biochem., 1977, 79, p. 166—180.
- Chapuis-Cellier C., Arnaud P.— Anal. Biochem., 1981, 113, p. 325—331.
- Danno G.— Ibid., 1977, 83, p. 189—193.
- Delincée H., Radola B. J.— Ibid., 1978, 90, p. 609—623.
- Delmotte P.— Sci. Tools, 1977, 24, p. 33—41.
- Epstein H. F., Wolf J. A.— Anal. Biochem., 1976, 76, p. 157—169.
- Gelsema W. J., De Ligny C. L., Van der Veen N. G.— J. Chromatogr., 1979, 173, p. 33—41.
- Gianazza E., Chillemi F., Righetti P. G.— J. Biochem. and Biophys. Meth., 1980a, 3, p. 135—141.
- Gianazza E., Gelfi C., Righetti P. G.— Ibid., 1980b, 3, p. 65—75.
- Giometti C. S., Anderson N. G., Tollaksen S. L., Edwards J. J., Anderson N. L.— Anal. Biochem., 1980, 102, p. 47—58.
- Goldsmith M. R., Rattner E. C., Koehler M. M. D., Balikov S. R., Bock S. C.— Ibid., 1979, 99, p. 33—40.
- Görg A., Postel W., Westermeier R.— Ibid., 1978, 89, p. 60—70.
- Görg A., Postel W., Westermeier R. et al.— J. Biochem. and Biophys. Meth., 1980, 3, p. 273—284.
- Hari V.— Anal. Biochem., 1981, 113, p. 332—335.
- Hjelmeland L. M., Nebert D. W., Chrambach A.— Anal. Biochem., 1979, 95, p. 201—208.
- Hirabayashi T.— Ibid., 1981, 117, p. 443—451.
- Horejši V., Tichá M.— Ibid., 1981, 116, p. 22—26.
- Horst M. N., Mahaboob S., Basha M. et al.— Ibid., 1980, 102, p. 399—408.
- Jäckle H.— Ibid., 1978, 98, p. 81—84.
- Jackowski G., Liew C. C.— Ibid., 1980, 102, p. 321—325.
- Kuhn O., Wilt F. N.— Ibid., 1980, 105, p. 274—280.
- Laas T., Olsson I., Soderberg L.— Ibid., 1980, 101, p. 499—461.
- Legraverend M., Glazer R. I.— Biochim. et biophys. acta, 1980, 607, p. 92—101.
- O'Farrell P. H.— J. Biol. Chem., 1975, 250, p. 4007—4021.
- O'Farrell P. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H.— Cell, 1977, 12, p. 1133—1142.

ЧАСТЬ ВТОРАЯ

ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ВВЕДЕНИЕ

Рассмотрение различных вариантов иммуноэлектрофореза естественным образом завершает начатое еще в предыдущей книге изложение методов фракционирования белков и нуклеиновых кислот в электрическом поле. В любом из вариантов иммуноэлектрофореза обязательно имеет место явление иммунопреципитации. Это явление широко используется и само по себе — как плодотворный способ высокоизбирательной очистки белков, а также для обнаружения иммуноспецифических продуктов фракционирования, проведенного с помощью обычного электрофореза или ИЭФ. Поэтому представляется целесообразным предварить рассмотрение собственно иммуноэлектрофореза описанием механизма и особенностей метода иммунопреципитации. Однако многие из этих особенностей, в частности очень важные явления неоднозначности иммунного ответа и полиморфизма иммунных реакций, нельзя понять без хотя бы беглого, но не слишком поверхностного знакомства с механизмом выработки иммунитета, строением и функцией иммуноглобулинов, природой сил взаимодействия между антителами и антигенами и т. д. Эти же представления окажутся необходимыми в следующей части книги при рассмотрении радиоиммунных методов исследования. Между тем в большинстве случаев биохимики и молекулярные биологи довольно плохо знакомы с современной иммунохимией, претерпевающей к тому же пору бурного развития.

Все это оправдывает включение в изложение довольно подробного введения в иммунохимию, которое поможет любому читателю осмыслить и обоснованно применять практические рекомендации по получению и очистке иммунных антисывороток.

В гл. 2 описано применение таких сывороток для иммунологического анализа результатов обычного электрофореза и ИЭФ. Следующие три главы целиком посвящены разбору различных вариантов и возможностей собственно иммуноэлектрофореза, проводимого главным образом в гелях агарозы.

ОСНОВЫ ИММУНОХИМИИ

Методы иммунохимии за последние годы заняли важное место в исследованиях белков и нуклеиновых кислот. Это обусловлено уникальной возможностью обнаружения и выделения индивидуальных белков и нуклеопротеидов из сколь угодно сложной их смеси с помощью специфических «антител», вырабатываемых в организме соответствующим образом иммунизированного животного. Однако эти методы, наряду со своей ни с чем не сравнимой избирательностью, таят в себе и возможности серьезных ошибок. Дело в том, что при реальной постановке эксперимента всегда есть место для сомнения в том, действительно ли используемая популяция антител специфична, тем более что антителам, как будет видно из дальнейшего, иногда присуща определенная «поливалентность», т. е. способность взаимодействовать с различными «антигенами», в частности с различными белками.

Для того чтобы ясно оценить возможности использования такой искусственной системы и характер информации, которую можно при этом получить, следует хотя бы в общих чертах рассмотреть нормальное развитие событий в организме, акцентируя свое внимание на особенностях синтеза, строения и функционирования антител. Разумеется, не следует пытаться здесь проникнуть в глубину огромной и весьма специальной области иммунологии. Предлагаемый ниже очерк имеет своей задачей только ввести читателя в круг изучаемых проблем и помочь ему найти общий язык со специалистами — иммунологами и иммунохимиками.

ЗАЩИТНЫЙ АППАРАТ ОРГАНИЗМА ВЫСШИХ ЖИВОТНЫХ

Компоненты крови

Кровь высших животных, наряду с функциями доставки к клеткам кислорода, питательных веществ и гуморальных факторов регуляции, удаления углекислого газа и продуктов клеточного катаболизма, выполняет еще и важнейшую функцию транспорта средств защиты организма от чужеродных и нередко смертельно опасных вторжений.

Если в пробирку с кровью добавить антикоагулянт (например, гепарин) и подождать, пока плавающие в жидкости клетки сядут на дно, то над массой красных кровяных клеток (эритроцитов) можно будет заметить тонкий белый слой. Это — белые кровяные клетки (лейкоциты). Подробнее мы познакомимся с ними ниже, а сейчас заметим, что лейкоциты крупнее эритроцитов и что по количеству их примерно в тысячу раз меньше.

Впрочем, каждый миллилитр крови все же содержит 5—10 млн лейкоцитов.

Жидкость крови, свободная от клеток, носит название *плазмы* крови. На долю плазмы приходится около 55% общей массы крови. В ней растворены сахара, гормоны, витамины, соли и прочие низкомолекулярные вещества, а также многочисленные белки крови. Иммунологи, как правило, имеют дело не с плазмой, а с *сывороткой* крови. Так называют плазму, освобожденную от фибриногена. Ее очень просто получить, если дать крови в пробирке свернуться в отсутствие антикоагулянтов и удалить образовавшийся сгусток центрифугированием (предварительно его надо отделить от стенки стеклянной пробирки, к которой он прилипает). Основную массу белков сыворотки составляют альбумины и глобулины. Это грубое деление белков сыворотки на два класса было первоначально введено, исходя из различия в их растворимости. Глобулины осаждаются полунасыщенным раствором сульфата аммония ($\sim 2\text{ M}$), а альбумины в нем растворимы. По растворимости же глобулины иногда подразделяют на эуглобулины («истинные» глобулины), нерастворимые в дистиллированной воде, и псевдоглобулины — в ней растворимые.

Более современный критерий различия белков сыворотки — электрофоретическая подвижность. При слегка щелочных значениях pH наибольшим отрицательным зарядом и подвижностью обладают альбумины, затем следуют в порядке убывания электрофоретической подвижности α -, β - и γ -глобулины. При pH 8,6 последние заряжены слабо. Именно в состав γ -глобулинов и входят различные типы иммуноглобулинов (антител), участвующих в иммунной реакции организма.

Имеет смысл сразу же обратить внимание на возможную путаницу обозначений. Среди рассматриваемых ниже пяти типов иммуноглобулинов богаче других представлены в крови и главным образом используются для исследовательских целей иммуноглобулины типа G, обозначаемые «IgG». Входящие в их состав «тяжелые» полипептидные цепи (см. ниже) тоже обозначаются греческой буквой γ . Очевидно, что понятие « γ -цепь» иммуноглобулина значительно уже, чем собирательное название γ -глобулины, включающее в себя широкий спектр белков — как различных иммуноглобулинов, так и белков неиммунной природы.

Растворенные в сыворотке иммуноглобулины, наряду с лейкоцитами, входят в состав защитной системы организма. Здесь уместно уточнить смысл некоторых терминов, которыми в дальнейшем мы будем пользоваться. Термин *антитела* не вполне тождествен понятию иммуноглобулины. Этим термином обозначают только ту часть популяции молекул иммуноглобулинов, которая приобрела специфичность, необходимую для ликвидации последствий вторжения в организм вполне определенных чужеродных субстанций, будь то белки или иные макромолеку-

лы, микроорганизмы, вирусы, отдельные клетки или даже многоклеточные трансплантаты. Сами эти субстанции именуют в данном случае *антигенами*. Таким образом, в понятие «антитело» неявно входит представление об антигене, определившем специфичность этого антитела.

Сыворотку, содержащую антитела определенной специфичности, часто называют *антисывороткой*, подчеркивая этим, что речь идет о сыворотке крови животного, успевшего выработать иммунный ответ на введение в его организм определенного антигена. Иногда в наименование антисыворотки, помимо вида иммунизированного животного, включают еще и название стимулировавшего эту антисыворотку антигена, а также указание на то, какой организм служил источником антигенов. Наименование получается довольно громоздким, но зато несет в себе полную информацию, исключаящую недоразумения.

Названия антигенов и их доноров обычно пишут вслед за словом «против». Например, выражение «антисыворотка кролика против эритроцитов козы» означает, что эритроциты, полученные из крови козы, были введены кролику и речь идет о сыворотке иммунизированного таким образом кролика. В качестве комплекса антигенов могут выступать и сами иммуноглобулины или даже вся сыворотка крови. В этом смысле надо понимать такие названия, как «антисыворотка кролика против иммуноглобулинов человека» или «антисыворотка человека против сыворотки кролика». В английской литературе встречается аналогичная конструкция, где роль слова «против» играет предлог «to», например «rabbit antiserum to human immunoglobulins» или конструкция с перестановкой «anti-human immunoglobulins rabbit serum». Оба эти написания эквивалентны.

Теперь рассмотрим защитные средства организма более подробно.

Фагоцитоз, комплемент и цитоинтоксикация

Прежде чем разобрать состав защитных средств, назовем сами способы защиты, хотя их, пожалуй, точнее было бы называть «способами атаки на непрошенных пришельцев». Начнем с явления *фагоцитоза*. Специализированные крупные клетки, которые объединяют общим названием «фагоциты», встречаясь с инвазивными (чужеродными) клетками меньшего размера, например с бактериями или вирусами, буквально «заглатывают» их и уничтожают. Последовательность событий фагоцитоза представлена на рис. 19.

Соприкоснувшись с чужеродной клеткой и «узнав» ее, фагоцит обволакивает «противника» своей наружной мембраной, для чего на прилегающем к нему участке мембрана выпячивается внутрь фагоцита, образуя подобие мешка. Это явление называется *инвагинацией*. Затем мешок отрывается, наружная

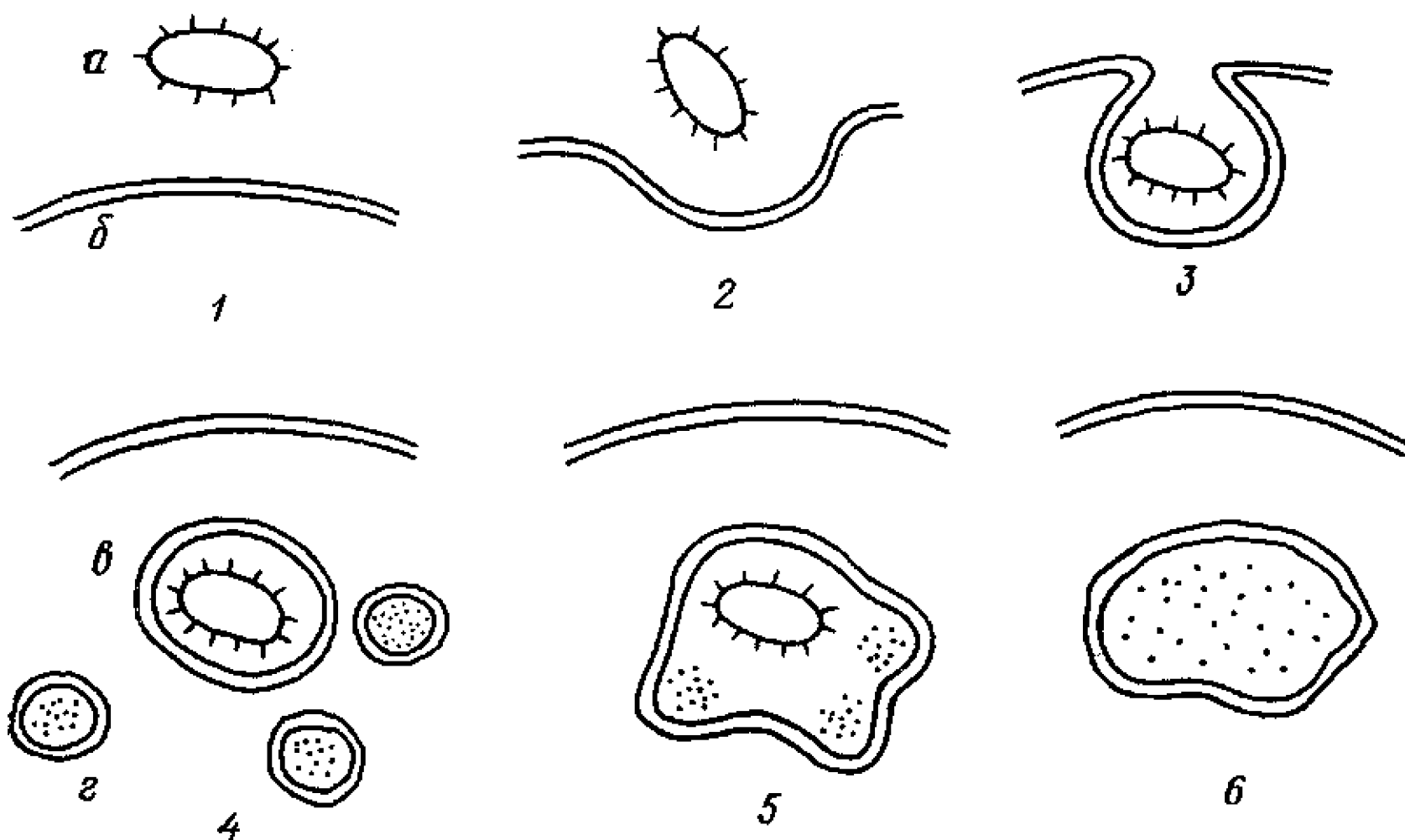


Рис. 19. Последовательность событий фагоцитоза

1 — узнавание; 2 и 3 — инвагинация; 4 — образование вакуоли; 5 — слияние вакуоли с лизосомами; 6 — лизис бактерии; а — бактерия; б — наружная мембрана; в — вакуоль; г — лизосомы

мембрана восстанавливается, а бактерия или вирус внутри образовавшегося пузырька (вакуоли) погружается в цитоплазму фагоцита. Здесь к вакуоли устремляются лизосомы. Окруженные своими мембранами, они несут целые наборы литических ферментов, способных разрушить оболочку бактерии или капсиду вируса и раздробить их содержимое. Мембраны лизосом сливаются с мембраной вакуоли, литические ферменты освобождаются и начинают свою атаку.

Второй вариант — разрушение чужеродной клетки прямо в кровеносном русле. Он используется и для атаки на бактерии, но особенно ценен в случае вторжения крупных клеток, которые не могут быть захвачены фагоцитами. Атаку осуществляет целый набор белков крови (изучено девять белков этого набора), которые объединяют общим названием «комплемента». Эти белки один за другим прилипают к наружной мембране чужеродной клетки и активируют друг друга так, что последний из них приобретает высокую литическую активность и «вскрывает» вторгшуюся клетку. Здесь тоже все начинается с антител, узнающих «противника» и указывающих его белкам комплемента, которые сами по себе никакой специфичностью не обладают. Первый из цепи этих белков присоединяется, собственно говоря, не к поверхности клетки, а к антителу, но только после того как оно свяжется с соответствующим антигеном в мембране инвазивной клетки. Наконец, третий, менее других изученный вариант «контратаки» — это отравление чужеродных клеток токсинами, которые выделяют при контакте с ними специали-

рованные для этой цели защитные клетки («интоксикация»). И в этом случае узнавание обеспечивается антителами, находящимися на поверхности «клеток-убийц» (англ. «killer cells»). Именно такие процессы характерны для отторжения трансплантата.

Лейкоциты

Представив себе способы защиты организма от вторжений, познакомимся с самими защитниками. Их «переднюю линию» составляют циркулирующие в крови лейкоциты. Под этим общим названием объединяются клетки разной специализации. Это, во-первых, гранулоциты, или, как их еще называют, «полиморфноядерные» лейкоциты. Первое название связано с наличием в цитоплазме гранулоцитов множества мелких гранул, очень похожих на лизосомы, второе отмечает причудливое разнообразие форм сегментированных ядер этих клеток. По характеру окрашивания гранулоциты подразделяют на эозинофилы, которые красятся только кислыми красителями (например, эозином), базофилы, которые окрашиваются только основными красителями, и нейтрофилы, которые можно выявлять красителями как кислой, так и основной природы.

Больше всего в крови нейтрофилов. Они являются фагоцитами и первыми атакуют микроорганизмы, появляющиеся в крови животного. При инфекции их содержание в кровотоке может увеличиваться более чем в пять раз. Данные относительно специализации базофилов и эозинофилов менее определены. Первые способствуют развитию воспалительного процесса, вторые причастны к аллергическим реакциям. Гранулоциты вырабатываются главным образом в костном мозге и частично в селезенке. Они постоянно обновляются — время их жизни составляет всего несколько дней.

Вторая группа лейкоцитов крови — это моноциты (мононуклеарные лейкоциты). Они крупнее гранулоцитов и имеют одно, четко очерченное ядро. Моноциты тоже являются фагоцитами, но содержание их в крови невелико. Собственно говоря, в крови они находятся лишь на своем пути к тканям тела, где моноциты склонны задерживаться и существовать в течение недель и месяцев. Там они становятся еще крупнее, а их фагоцитарная активность возрастает. На этой стадии зрелости моноциты именуют «макрофагами». В тканях они выполняют ту же очистительную функцию, что и гранулоциты в кровеносном русле. Особенно много макрофагов откладывается в печени, селезенке и лимфатических узлах.

Наконец, третью группу лейкоцитов составляют лимфоциты. Размеры их варьируют в довольно широких пределах (5—15 мкм). Мелкие лимфоциты — это потомки крупных. До момента своей активации при встрече с инфекцией они не делятся и могут циркулировать в крови месяцы и годы. По их поверхностным антигенным свойствам лимфоциты принято делить на

две группы — Т- и В-клетки. В состав первой группы входят лимфоциты, сильно различающиеся по своей специализации. Так, к ним относятся и упомянутые выше «клетки-убийцы», и клетки, помогающие активации В-клеток для образования антител, и клетки, регулирующие это образование. Основное назначение В-клеток, как уже ясно, состоит в том, чтобы продуцировать антитела. Собственно говоря, эту функцию выполняют не сами В-лимфоциты, а их потомки — плазматические клетки, или *плазмациты*.

Будучи активированы встречей с инфицирующим агентом (антигеном), «узнав» его и как-то получив подтверждение этого узнавания от Т-клеток, В-клетки преобразуются. Ускоряются процессы метаболизма, увеличиваются размеры, спустя некоторое время возобновляется синтез ДНК, за которым следует деление клеток. Часть потомства активированных таким образом В-клеток сохраняет все признаки своих родителей и лишь многократно увеличивает численность В-клеток, специфических для данного антигена. В условиях острых инфекций В-клетки дают клоны, насчитывающие сотни тысяч клеток-потомков одного активированного лимфоцита (в искусственных условиях, когда физиологический контроль подавлен, удается получать клоны В-лимфоцитов размером до 10^{11} клеток). Так формируется «иммунологическая память», иммунитет в практическом смысле этого слова, т. е. способность организма к быстрой и массовой ответной реакции на повторное проникновение в него инфицирующих агентов.

Сама же ответная реакция, в том числе и при первичном заражении, развивается за счёт превращения другой части потомства активированных В-клеток в плазмациты. Увеличивается объем цитоплазмы, ядро оттесняется в сторону, разрастается ретикулярная система, появляются все компоненты, необходимые для массированного синтеза и секреции белков. Шероховатые мембраны с сидящими на них полисомами окружают внутренние мешочки и каналы, по которым новосинтезированные антитела переходят в хорошо развитый аппарат Гольджи и с его помощью выводятся наружу. Начинается поступление в кровь специфических антител — первичный иммунный ответ. Каждый плазмацит секретирует до двух тысяч антител в секунду. Это происходит уже не в кровотоке, а в лимфатических узлах, где плазмациты оседают, но начальный толчок трансформации в плазмацит дает первая встреча прародительской пассивной В-клетки с активировавшим ее чужеродным агентом. Эта встреча происходит в кровеносном русле, в тканевой жид-

Теперь пора указать, каким образом Т- и В-клетки «узнают» инфицирующие агенты и все ли лимфоциты способны к «узнаванию» данного конкретного агента или только те немногие из них, которые заранее располагали его «приметами». По современным представлениям, имеет место именно последнее. Инструментом же «узнавания» опять-таки служат антитела. Они покрывают поверхность циркулирующих в крови, «дозорных» лимфоцитов. На поверхности В-клетки уместается примерно 100 000 молекул антител. Все они одинаковы и обладают одной и той же антигенной специфичностью, т. е. несут в самой своей структуре «приметы» одного определенного чужеродного агента — антигена. То же самое характерно и для Т-клеток, хотя число антиген-специфических рецепторов на их поверхности примерно в 10 раз меньше. Это означает, что столкновение с многими тысячами лимфоцитов для вторгшихся инфекционных агентов, бактерий или вирусов пройдет без последствий. Они могут свободно циркулировать, пока не будут «опознаны» при столкновении с поджидавшим именно их лимфоцитом. На это может уйти много времени, особенно при первичном заражении, когда концентрация лимфоцитов нужной специфичности еще мала. Впрочем, следует иметь в виду, что в организме человека содержится примерно 10^{12} лимфоцитов, так что на долю каждого варианта специфичности поверхностных антител приходится не такое уж малое их число. Ну, а уж после того, как «роковая» встреча произошла, события развиваются неумолимо. В-клетки порождают плазматиты, которые начинают массовую продукцию антител, причем именно той самой специфичности, которой обладали антитела, покрывающие поверхность исходной В-клетки. В крови человека циркулируют и постоянно обновляются примерно 10^{19} антител. После описанных событий заметную долю их составят антитела, способные узнать обнаруженных ранее «чужаков». Приметы этих последних оказываются размноженными в миллиардах копий. Их разносят по всему организму подвижные молекулы антител, способные, как было упомянуто, указывать дорогу фагоцитам и комплементу. Уничтожение обнаруженного противника — теперь уже только вопрос времени и соотношения сил к моменту, когда мобилизация будет завершена. Сущность иммунитета — в ускорении всего этого процесса за счет увеличения начальной концентрации дозорных В-клеток определенной антигенной специфичности, остающихся после первого заражения. Теперь, при повторном заражении соотношение сил с самого начала оказывается сдвинутым в пользу защитников организма, и они могут расправиться с вторжением без внешних признаков заболевания.

Т-лимфоциты поступают в кровь из тимуса, где они проходят этап дифференцировки. Их предшественники, образованные в костном мозге, поступают в тимус из кровотока. Здесь их поверхность одевается рецепторами и происходит специализация Т-лимфоцитов разного назначения (см. выше).

Тимус хорошо выражен при рождении (запас лимфоцитов начинает вырабатываться еще в нательный период), растет до созревания организма и уменьшается к старости. В ходе серьезной болезни тимус заметно сжимается. Во взрослом состоянии животного его можно удалить, и ослабление иммунной системы обнаружится лишь через годы, когда начнет исчерпываться запас Т-клеток.

При встрече со своим специфическим антигеном Т-клетки активируются и делятся так же, как В-клетки, но не перерождаются в плазматиты. Выше указывалось, что основная роль Т-клеток — это подтверждение узнавания антигенов В-клетками и помощь последним в их продуктивной трансформации. Однако среди Т-лимфоцитов есть и такие, которые выполняют прямо противоположную функцию, т. е. подавляют активность и трансформацию В-лимфоцитов, несмотря на встречу с соответствующими антигенами. Это имеет место в тех случаях, когда такие встречи происходят перманентно, что означает принадлежность соответствующих антигенов к числу собственных белков организма. Очевидно, что в этом случае специализированные Т-клетки удерживают организм от губительной аутоиммунной реакции.

В-лимфоциты образуются в костном мозге и селезенке (у зародышей — в печени). После нескольких митотических делений крупных лимфоцитов-предшественников продуцируются зрелые мелкие лимфоциты, на их поверхности располагаются синтезированные одновременно антитела и деление прекращается до момента активации при встрече с антигеном.

«Прародителями» всех клеточных элементов крови (включая и эритроциты) являются гематогенные стволовые клетки костного мозга, или бластоциты.

Антитела

Об антителах уже много было сказано при описании клеточных элементов защитной системы организма. Уже упоминалось, что антитела способны «узнавать» чужеродные инфицирующие агенты. Они осуществляют это путем образования стабильных комплексов с соответствующими антигенами: белками, полисахаридами, липидами, а также функциональными группами, находящимися на поверхности вторгающегося микроорганизма, вируса или клетки. Роль антигенов могут играть и свободные макромолекулы, проникающие в кровь животного. Низкомолекулярные вещества сами по себе антигенами служить не могут и иммунного ответа не вызывают, но в соединении с белками или другими макромолекулами могут вносить свой вклад в специфику иммунитета (см. ниже о гаптенах).

Свободные антитела кровотока, столкнувшись с соответствующими им антигенами на поверхности бактерии или вируса, «сажаются» на эту поверхность. Они облепляют чужеродную

клетку и хотя и не разрушают ее сами, но чрезвычайно эффективно помогают макрофагам и гранулоцитам осуществить процесс фагоцитоза. Механизм этой стимуляции пока не выяснен; ее называют «опсонизацией». Вторая «наводящая» функция антител — это привлечение комплемента для разрушения чужеродных клеток прямо в русле кровотока. О ней достаточно было сказано выше. Свободные антитела, выполняющие две эти защитные функции, относятся главным образом к одному, доминирующему в крови классу иммуноглобулинов — классу IgG.

Необходимость быстрого включения массивированной выработки антител определенной специфичности в ответ на вторжение соответствующего антигена обусловила создание механизма «узнавания» чужеродных агентов (антигенов) с целью включения специфической трансформации В-лимфоцитов. Как уже указывалось, это «узнавание» тоже осуществляют иммуноглобулины, точнее их активные фрагменты (рецепторы), находящиеся на поверхности Т- и В-лимфоцитов. Они относятся к иному классу иммуноглобулинов — классу IgM.

Здесь можно усмотреть противоречие с приведенным выше описанием трансформации В-клеток в плазматиты, где утверждалось, что последние продуцируют антитела той же самой специфичности, которой обладали антитела, покрывавшие поверхность исходной В-клетки. Но противоречия нет, так как в этом случае иммуноглобулины IgG и IgM имеют одинаковую антигенную специфичность, т. е. «узнают» один и тот же антиген. Различия, заставляющие отнести их к разным классам иммуноглобулинов (см. ниже), относятся к тем структурам этих молекул, которые не участвуют в узнавании антигенов. Эти различия обусловлены спецификой роли, которую играют те и другие иммуноглобулины.

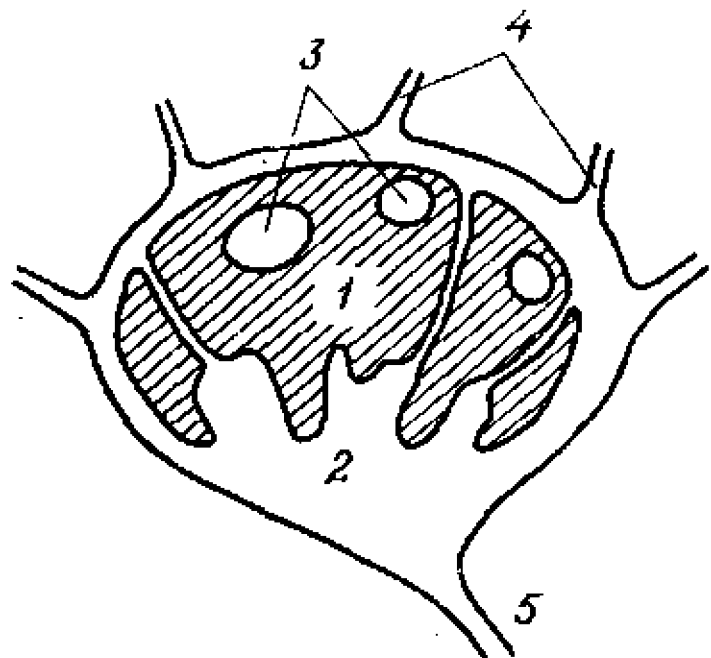
Лимфатическая система и селезенка

Помимо мобильной защитной системы, представленной кочующими в кровеносном русле лейкоцитами и растворенными в сыворотке антителами, организм высших животных оснащен еще и несколькими системами стационарных защитных устройств, играющих роль своеобразных фильтров. Важнейшей из таких систем является сеть лимфатических сосудов и узлов. Кровь из капилляров с артериальной стороны поступает в межклеточное пространство, откуда потом собирается в венозные капилляры. Однако ток жидкости в этих двух системах не совсем одинаков. Параллельно с венозными капиллярами существует еще одна «дренажная» система — разветвленная сеть мельчайших лимфатических сосудов, начинающихся в межклеточном пространстве. Далее они сливаются в более крупные сосуды, откуда межклеточная жидкость (лимфа) поступает в крупные вены и, следовательно, обратно в кровоток. Лимфа

движется по своей системе относительно медленно. На ее пути расположены лимфатические узлы (рис. 20). При подходе к узлу лимфатический сосуд разделяется, как дельта реки, на множество рукавов. Выходит лимфа из узла по одному каналу (внизу). Какая-то доля чужеродных антигенов из кровотока или межклеточного пространства неизбежно попадает в лимфатическую систему. Находясь в лимфатическом узле, антигены не

Рис. 20. Схема лимфатического узла

1 — кортекс; 2 — медулла; 3 — фолликулы; 4 — подходящие к узлу лимфатические сосуды (разветвление); 5 — выходящий из узла лимфатический канал



могут избежать встречи с гранулоцитами, макрофагами и лимфоцитами, ибо лимфатический узел буквально набит ими. В верхнем корковом слое (кортексе) расположены в основном лимфоциты, опознающие пришельца. Ниже лежат плазматиты, синтетическая деятельность которых обусловлена предшествующей активацией лимфоцитов коркового слоя. Это — «фабрики» антител. Через лимфатический канал антитела уходят в кровоток, чтобы начать там «охоту» за свободными «собратьями» антигена, попавшегося «в сети» лимфатического узла.

Сам антиген тут же погибает, так как в нижнем слое лимфатического узла (медулле) располагаются макрофаги. В теле лимфатического узла имеются полости — фолликулы (см. рис. 20). Первоначальные циклы деления В-лимфоцитов, активированных встречей со своим специфическим антигеном, происходят именно здесь. В фолликулах располагаются так называемые дендритные клетки. Многочисленные выросты (дендриты) этих клеток образуют настоящий фильтр. Антигены налипают и задерживаются на поверхности дендритов. Сюда же поступают все новые партии лимфоцитов, циркулирующих в лимфе. Вероятность встречи соответственной пары лимфоцит — антиген значительно увеличивается. Как только такая встреча произошла, лимфоцит задерживается в фолликуле и начинает делиться. Некоторые из клеток его потомства приобретают свойства плазматитов и здесь же неподалеку, в подкорковом слое, начинают гиперпродукцию соответствующих антител. Другие, мелкие лимфоциты-потомки уходят из фолликулы в кровоток, чтобы затем сохраняться в организме в качестве иммунологической памяти. При массированных вторжениях антигенов в фолликулах одно-

временно делятся несколько десятков активированных лимфоцитов, образуя так называемый «зачаточный центр».

Основным фильтром, очищающим от антигенов саму кровь, является селезенка. Эволюционно она старше лимфатической системы. В ней сосредоточены макрофаги, а также имеется механизм непрерывного удаления изношенных эритроцитов. Наряду с ним работает и механизм удаления обломков чужеродных клеток и сделавших свое дело макрофагов.

В стенках кишечника есть свои устройства — целые агрегаты лимфатических клеток, защищающие организм от проникновения в кровь полимерных антигенов и микробов из пищеварительного тракта.

Теперь мы можем окинуть взглядом всю «армию», защищающую организм. В первых рядах выступают подвижные элементы крови — гранулоциты, осуществляющие фагоцитоз. В сыворотке крови растворены многочисленные антитела разнообразной антигенной специфичности, готовые узнать и пометить собой любого «неприятеля». Вслед за ними мобилизуют свои разрушительные возможности белки комплемента. Тут же циркулируют в состоянии наблюдения-ожидания многочисленные лимфоциты, каждый со своим набором расположенных на поверхности узнающих иммуноглобулинов.

В межклеточных пространствах всех тканей организма на страже находятся макрофаги. Здесь же — вездесущие антитела-«наводчики» и контролеры-лимфоциты. Вторая линия обороны — стационарные защитные комплексы универсального характера (лимфатические узлы и питающая их система лимфатических сосудов). В лимфатических узлах располагается и аппарат иммунного ответа: зачаточные центры в фолликулах, где вырабатываются специфические В-лимфоциты, а в медулле — плазматиты, стимулированные к массированному синтезу необходимых для защиты антител. Специализированные функции очистки крови, в том числе и от обломков чужеродных агентов, выполняет селезенка. Наконец, свои специфические устройства для создания барьеров против инфекции существуют в стенках кишечника и в других слизистых оболочках, контактирующих с внешней средой. Здесь основную роль играет специальный иммуноглобулин IgA, секретируемый вовне, для того чтобы уже на подходе к слизистой оболочке «узнать» и пометить соответствующие антигены.

Если и не вся последовательность описанных событий, то по крайней мере ее начальные этапы, приводящие к гиперпродукции специфических антител, протекают в организме животного и в ответ на введение ему антигенов белковой и небелковой природы, находящихся не на поверхности клеток, а в растворе. Этим и пользуются в биохимической практике для выработки специфических антител к определенным антигенам. Антитела затем извлекают из крови иммунизированного таким способом животного, очищают и используют для исследовательских целей, как описано ниже.

Затухание иммунного ответа

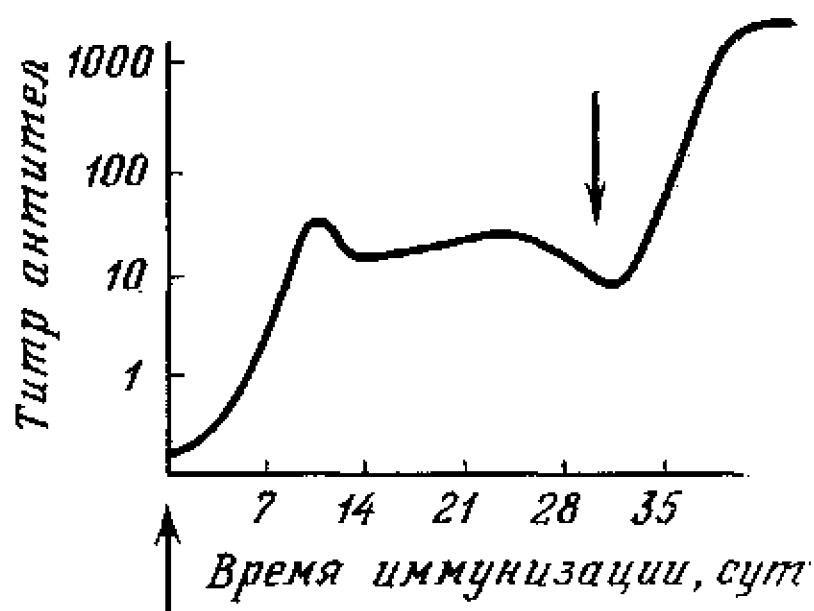
Длительность состояния активного иммунного ответа на инфекцию определяется временем жизни антител и продолжительностью активности зрелых плазматиков, которая составляет в среднем 2—4 дня. В этот период идет массивная продукция антител, а затем она затухает. Однако небольшая часть плазматиков продолжает поставлять в кровь специфические антитела долго — месяцы и даже годы после подавления инфекции. Это обстоятельство, наряду с длительностью жизни В-лимфоцитов, обеспечивает сохранение иммунитета, так как свободные антитела живут относительно недолго. Время полужизни IgG крыс составляет примерно 6 дней, IgM еще меньше — 18 ч. У человека антитела немного более устойчивы: половина свободного IgG в крови разрушается за 2 недели.

Динамика иммунизации

На рис. 21 представлена типичная кривая изменения содержания антител в крови животного в ходе иммунизации. Следует обратить внимание на то, что концентрация специфических антител по оси ординат отложена в логарифмическом масштабе. Вслед за первичной инъекцией антигена следует латентный период продолжительностью в 2—3 дня. В это время идут процессы узнавания антигена и его «обработки» в макрофагах и лимфоцитах, происходит активация В-клеток и появляются специализированные для данной инфекции плазматиче- ские клетки. Далее

Рис. 21. Динамика нарастания содержания антител в крови в ходе иммунизации

Стрелками показаны моменты первичного и вторичного введения антигенов



наступает логарифмическая фаза синтеза и соответственно увеличения содержания антител в крови. Затем следует «плато», а примерно через 3 недели в отсутствие дополнительной иммунизации начинается постепенное снижение концентрации антител за счет их разрушения, прекращения деятельности плазматических клеток и исходной активации В-клеток. Последнее происходит ввиду истощения антигенов, разрушаемых макрофагами и комплементом.

При повторном введении антигена описанный механизм иммунологической памяти обеспечивает быстрое увеличение содер-

жания антител в крови, причем в сотни раз более значительное, чем при первичной иммунизации тем же антигеном. Это усиление иммунного ответа («booster») особенно ярко выражено в случае слабой первичной реакции. Нередко для получения максимальных концентраций («титров») антител введение новых порций антигена повторяют 3—4 раза с интервалами в 1—2 недели, в зависимости от вида животного, как это показано ниже на конкретных примерах.

При иммунизации в ходе первичного ответа в крови сначала появляются иммуноглобулины типа IgM. Они обнаруживаются уже через 36—48 ч после введения антигена. Молекулы IgM первыми вступают в борьбу с инфицирующим агентом. Они особенно эффективны при стимулировании защитного действия компонента. При повторных иммунизациях вырабатывается в основном IgG. Его «наводящая» роль была подробно описана выше. Добавим, что IgG способен выполнять и самостоятельную защитную функцию — связываться с токсинами и нейтрализовать их.

СОЗДАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АРСЕНАЛА

По современным представлениям, для всех антигенов, которые могут быть введены животному, в его организме уже имеются готовые к узнаванию иммуноглобулины или рецепторы, расположенные на поверхности пусть многочисленных, но специфических лимфоцитов.

На первый взгляд это кажется невероятным, тем более что в роли антигенов могут выступать гаптены — почти любые химические соединения, конъюгированные с белками. Совершенно очевидно, что многие из этих веществ, созданных человеком, никогда не участвовали в процессе эволюции. Откуда же у организма может быть информация для синтеза специфических иммуноглобулинов, «узнающих» эти соединения?

Но что такое «узнавание» на молекулярном уровне?

В следующем разделе подробно рассмотрены структуры иммуноглобулинов, в том числе и строение области, обеспечивающей «узнавание» антигена. Пока скажем, что это — совокупность фиксированных в пространстве нескольких десятков аминокислот. «Выбор» этих аминокислот и даже не очень большие вариации их взаимного расположения открывают возможности для создания бесчисленного множества различных комбинаций. Мало того, система «узнавания» не только избыточна, но и наверняка «вырождена». Можно не сомневаться, что каждая комбинация аминокислот может «узнать» не одну, а несколько аналогичных (в смысле возможности взаимодействий) химических структур. Число элементов в этих структурах ограничено, а способы их объединения в молекулы должны укладываться в жесткие стерические и энергетические рамки. В результате этого число реальных и существенно отличающихся между собой комбинаций атомов в гаптенах отнюдь не бесконечно. К тому же

какая-то степень отличия, наверное, может быть несущественной для узнающей системы. Поэтому весьма вероятно, что и для новых, впервые созданных химических соединений среди предсуществующих «узнающих» комбинаций аминокислот в антителах найдутся примерно подходящие варианты. А уж если созданная человеком химическая структура окажется столь экзотична, что ничего похожего на нее в природе не существует, то она, вероятно, и не сможет выступить в роли антигена.

Таким образом, вопрос сводится к тому, может ли быть число пространственных комбинаций аминокислот в участках «узнавания» достаточно большим. По современным оценкам, число типов различных специфических антител выражается цифрой порядка 10^7 — 10^8 . Такое число комбинаций аминокислот может быть обеспечено действием трех факторов: множественностью генов, определяющих последовательности аминокислот в «узнающих» участках полипептидных цепей иммуноглобулинов (эта множественность может быть разумной — примерно 100 генов для каждой из двух полипептидных цепей, образующих центр «узнавания»); возможностью независимого объединения по два ста вариантов каждой из двух цепей, что дает уже 10^4 комбинаций; ускоренным процессом соматических мутаций в ходе первоначальной пролиферации В-клеток, в результате чего число комбинаций аминокислот может увеличиться еще на 3—4 порядка. В крови человека циркулирует около 10^{19} антител. Следовательно, на долю каждого из предполагаемых 10^8 различных их типов приходится в среднем еще по 10^{11} молекул.

Теперь необходимо познакомиться с тем, что известно о структуре иммуноглобулинов и антител, в частности о пространственной структуре «узнающих» антиген участков. Это не только позволит более конкретно представить себе возможности реализации приведенных оценочных расчетов, но и подведет нас к практически важному вопросу об однозначности иммунного ответа.

СТРУКТУРА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Общий план структуры. Классы иммуноглобулинов

Начнем с наиболее распространенного типа, обозначаемого IgG (иммуноглобулин G), на долю которого приходится до 75% общего количества иммуноглобулинов крови. Затем кратко познакомимся с отличиями и физиологической ролью других типов иммуноглобулинов. Как уже упоминалось, используемые в биохимических исследованиях свободные антитела — это иммуноглобулины типа IgG. Их удалось наблюдать под электронным микроскопом. Оказалось, как это и предполагали ранее, что молекулы IgG имеют конфигурацию буквы «Y». Удалось оценить размеры трех участков, составляющих эту конфигурацию (рис. 22). В областях присоединения участков F_{ab} к участку F_c

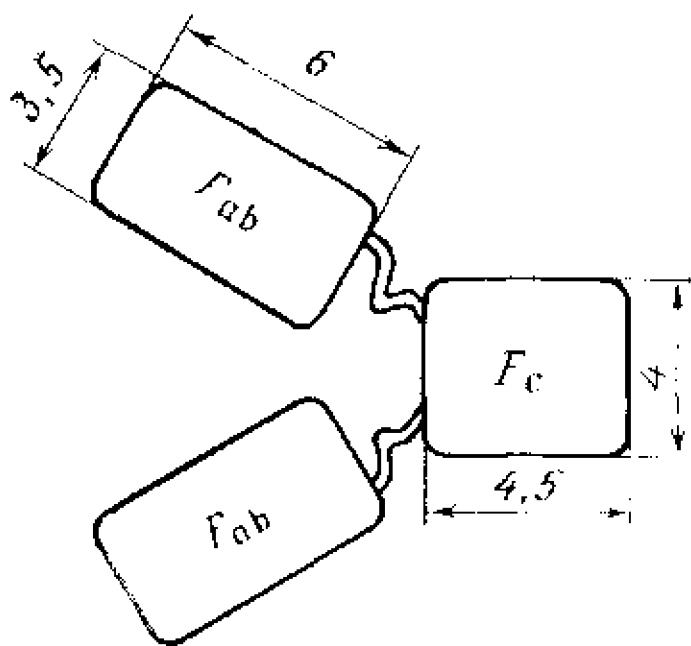


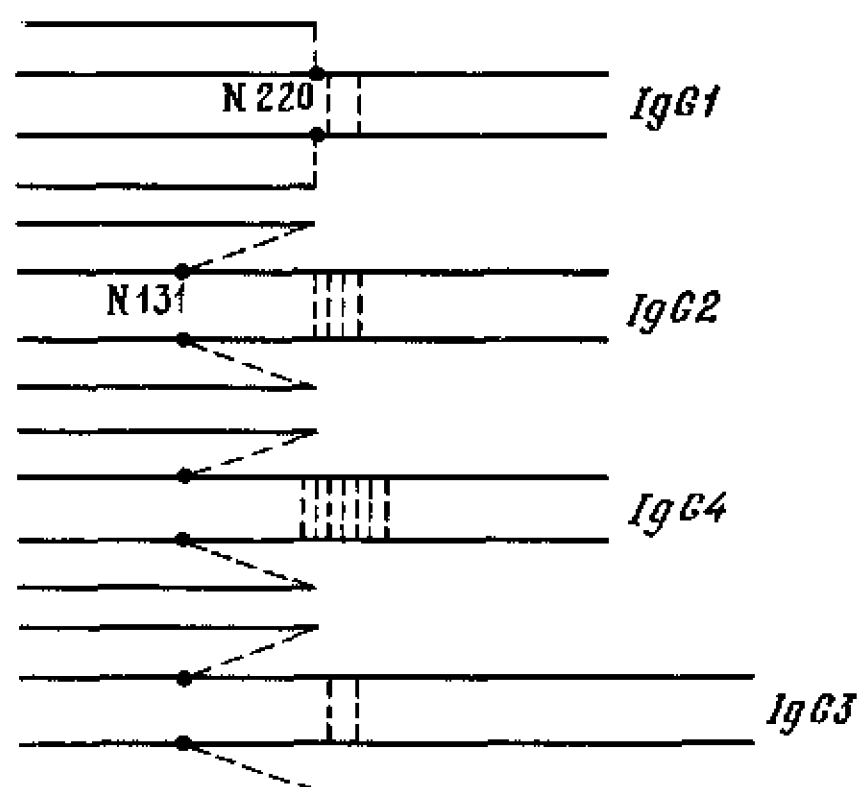
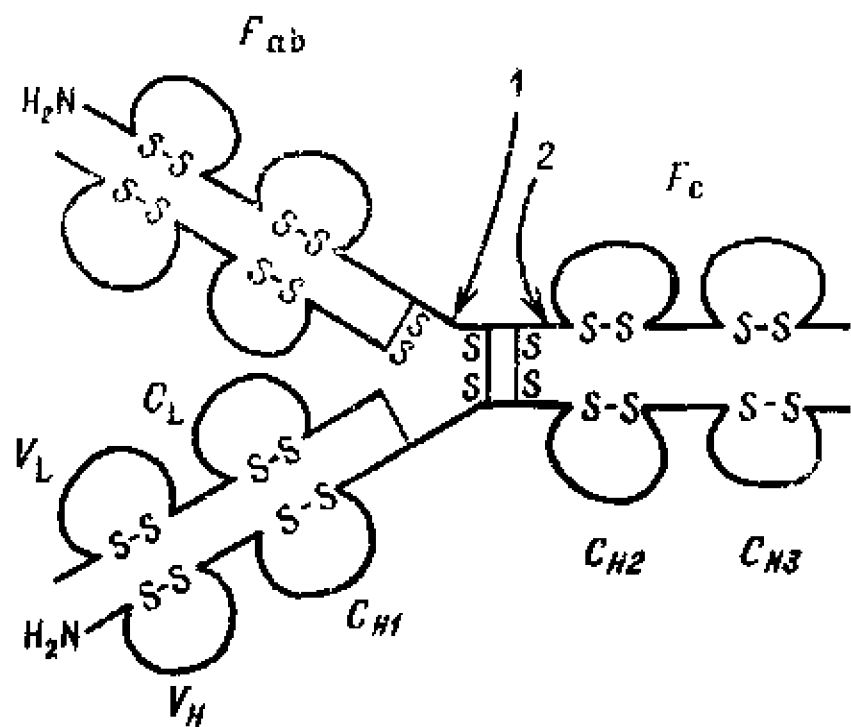
Рис. 22. Общая конфигурация молекулы IgG при исследовании в электронном микроскопе

Размеры указаны в нанометрах; обозначения — в тексте

Рис. 23. Схема расположения компонентов структуры IgG1 человека

Обозначения — в тексте; стрелками показаны места атаки протеолитических ферментов (1 — папаина, 2 — пепсина)

Рис. 24. Расположение дисульфидных мостиков (пунктир), связывающих полипептидные нити четырех типов IgG человека



имеется определенная свобода их взаимного перемещения, что отмечено ломаными линиями, обозначающими фактически находящиеся здесь гибкие отрезки полипептидных цепей. В связи с этим область сочленения участков молекулы иногда называют областью «шарнира».

Первичные структуры многих иммуноглобулинов разных типов и происхождения полностью расшифрованы. Они оказались удивительно похожими друг на друга. Из рис. 23 можно видеть, что три компактных участка IgG1 человека, наблюдаемые под электронным микроскопом, представляют собой двунитевые структуры. Полипептидные цепи в них связаны между собой силами гидрофобного взаимодействия, водородными связями и обозначенными на схеме дисульфидными мостиками. Такие же мостики выделяют внутри самих полипептидных цепей несколько областей, изображенных в виде петель. В состав молекулы IgG входят четыре полипептидные цепи. Две из них идут по всей длине молекулы, точнее вдоль ее «стержня» (F_c) и одного из разветвлений (F_{ab}). Их называют «тяжелые», или «H-цепи» (от англ. «heavy»). На участке F_c они объединены между собой в компактную двухнитевую структуру. В разветвлениях каждая

тяжелая цепь образует комплекс с еще одной, примерно вдвое более короткой и «легкой» L-цепью (от англ. «light»). Эти два комплекса обозначают «F_{ab}». Индекс «ab» расшифровывается как «antigen binding» — на концах комплексов расположены области связывания антигенов. Фрагменты F_c после их отделения сравнительно нетрудно кристаллизовать; это обстоятельство и отмечено индексом «с» («crystalline»).

Участки F_{ab} и F_c связаны между собой однонитевыми фрагментами тяжелых цепей, что, как отмечалось, обеспечивает определенную свободу взаимных перемещений этих участков.

Каждая из областей, изображенных в виде петель, содержит около 110 аминокислот. Указанные на рис. 23 обозначения этих петель легко понять, если учесть, что только ближние к NH₂-концам молекулы петли (как в тяжелой, так и в легкой цепи) вариabильны по своему аминокислотному составу. Последовательности аминокислот полипептидов, образующих все остальные петли, неизменны для всех молекул иммуноглобулинов данного типа. Это и отмечено обозначениями V («variable») и C («constant») — вариabильная и неизменная области. Дополнительные индексы H и L при этих обозначениях указывают на принадлежность соответствующей петли к тяжелой или легкой цепи. При этом две тяжелые и две легкие цепи в каждой молекуле иммуноглобулина попарно идентичны. Каждая легкая цепь содержит одну вариabильную и одну неизменную области, а каждая тяжелая — одну вариabильную и три неизменные области, не тождественные друг другу и потому обозначенные дополнительными индексами 1, 2 и 3.

Легкие цепи бывают только двух типов, обозначаемых κ и λ . Известно четыре различных типа тяжелых цепей IgG человека — γ_1 , γ_2 , γ_3 и γ_4 . Соответственно различают и четыре варианта иммуноглобулинов (от IgG1 до IgG4). Каждый из вариантов может быть построен двояко — с участием легких цепей κ или λ . Четыре варианта IgG человека различаются между собой и по числу дисульфидных мостиков, связывающих тяжелые цепи, и по местам присоединения дисульфидными мостиками легких цепей к тяжелым, как это показано на рис. 24, где для упрощения петли, входящие в состав полипептидных цепей, не показаны. На рисунке молекула IgG3 изображена длиннее остальных. Действительно, она несколько крупнее: ее молекулярная масса равна 170 000, в то время как для каждого из трех остальных IgG человека она составляет около 146 000. Кроме того, на участке F_c тяжелые нити γ_3 имеют по три петли вместо двух. Нормальное соотношение содержания четырех IgG в крови человека может быть представлено пропорцией 66:33:7:4 (от IgG1 до IgG4).

Фермент папаин «разрезает» тяжелые цепи любого из IgG на однонитевых участках «левее» дисульфидных мостиков, связывающих эти цепи (см. рис. 23). В результате получается два одинаковых фрагмента F_{ab} и фрагмент F_c. Фермент пепсин при pH 4—4,5 расщепляет те же цепи «правее» дисульфидных мости-

Таблица 1. Иммуноглобулины человека

Тип Ig	Обозначение тяжелой цепи	Константа седиментации, ед. Сведберга	Молекулярная масса, тыс. дальтон		Число доменов тяжелой цепи	Содержание углеводов, %
			полная	тяжелой цепи		
IgG1	γ_1	6,6	146 22	51	4	2—3
IgG2	γ_2	6,6	146	51	4	2—3
IgG3	γ_3	6,7	170	60	5	2—3
IgG4	γ_4	6,6	146	51	4	2—3
IgM	μ	19	970	65	5	12
IgA1	α_1	7	160	56	4	7—11
IgA2	α_2	7	160	52	4	7—11
sIgA*	α_1 или α_2	11	385	52—56	4	7—11
IgD	σ	7	184	69,7	5	9—14
IgE	ϵ	8	188	72,5	5	12

* Секреторный IgA.

ков. После обработки пепсином можно получить несколько укороченный фрагмент F_c' и комплекс обеих ветвей молекулы, который обозначают $F_{(ab')_2}$, подчеркивая этим, что здесь два несколько удлинённых по сравнению с предыдущим случаем двунитевых фрагмента $F_{ab'}$ объединены в один четырехнитевой комплекс.

На рис. 23 не показаны углеводы, входящие в состав молекул IgG. Они присоединяются к тяжелым цепям на участках C_H , и в иммунной реакции взаимодействия антитела с антигеном, по-видимому, непосредственного участия не принимают. Физиологическая роль этих углеводов освещена ниже.

У мышей тоже известно четыре варианта IgG, которые обозначают IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3. Со всеми этими обозначениями биохимику необходимо познакомиться, для того чтобы представлять себе, о чем идет речь, если он встретится с ними в иммунохимической литературе. С этой же целью в табл. 1 включены данные по остальным известным типам иммуноглобулинов человека, хотя с ними в качестве инструмента исследования биохимику приходится встречаться относительно редко.

Обратим внимание на обозначения тяжелых цепей во втором столбце таблицы. Сопоставляя значения молекулярных масс, нельзя не отметить необычайно большую массу IgM, который первым появляется в крови при иммунном ответе. Дело в том, что в свободном состоянии IgM поступает в кровь в виде пентамера, где пять одинаковых молекул примерно такого же типа, как IgG, связаны между собой наподобие звезды концами своих F_c -участков. Пентамеры IgM играют главную роль в элиминировании микроорганизмов и простейших паразитов, например малярийного плазмодия, размножающихся в крови. Они намного более эффективно, чем IgG, стимулируют атаку комплемента. На поверхности лимфоцитов, где IgM выполняют функ-

цию «узнавания» антигенов, они существуют в виде нормальных мономерных структур.

Также утяжеленными, в виде димеров, в некоторых случаях встречаются IgA(sIgA). Эти иммуноглобулины обнаруживаются главным образом в секреторных жидкостях (слюне, слезах, носовой и бронхиальной слизи), а также в желудочно-кишечном тракте. Они легко проходят клеточные барьеры и, как уже отмечалось, играют ключевую роль в отражении инфекционных вторжений «на переднем фронте» — в областях контакта организма со средой.

Относительно малочисленные иммуноглобулины типа IgE связаны с развитием аллергических процессов. Умеренная аллергия — защитная реакция организма, создающая воспалительный очаг в месте проникновения чужеродных агентов. Количество IgD в сыворотке человека очень мало, а в крови мышей он не обнаруживается вовсе. Основное местонахождение IgD — на поверхности лимфоцитов, где он как-то «сотрудничает» с IgM.

Мономерные молекулы иммуноглобулинов любого типа, находящиеся на поверхности лимфоцита, макрофага или гранулоцита, связываются с этой поверхностью своими F_c -участками. По этим же участкам присоединяются и первые молекулы компонента. Немалую роль в процессах «узнавания» и связывания, по видимому, играют входящие в состав молекул иммуноглобулинов сахара. Интересно, что с F_c -участками иммуноглобулинов (между областями C_{H_2} и C_{H_3}) способен прочно связываться некий хорошо изученный белок, который можно выделить из наружной мембраны бактерии *Staphylococcus aureus* («белок А»). С широкими возможностями его использования в исследовательских целях мы познакомимся ниже.

Области связывания антигенов

Сопоставление первичных структур тяжелых и легких цепей многих иммуноглобулинов, различающихся по своей антигенной специфичности, обнаружило, что и внутри переменных по своему составу областей V_H и V_L только короткие их участки варьируют действительно сильно. Эти участки встречаются примерно с одинаковой частотой как на V_H , так и на V_L . В их состав входят аминокислоты №№ 25—30, 55—60 и 95—98. Названные участки получили наименование «гипервариабельных областей» иммуноглобулинов. Естественно ожидать, что именно они определяют специфичное «узнавание» антигенов.

Чтобы реально представить себе, каким образом это «узнавание» может осуществляться, рассмотрим пространственную конфигурацию полипептидных цепей вариабельных петель V_H и V_L . Еще в 1960 г. удалось кристаллизовать F_{ab} -фрагменты некоторых IgG, а в 1974 г. путем рентгеноструктурного анализа с разрешением в 2 Å была получена полная пространственная структура IgG1 человека. Дальнейшие исследования показали,

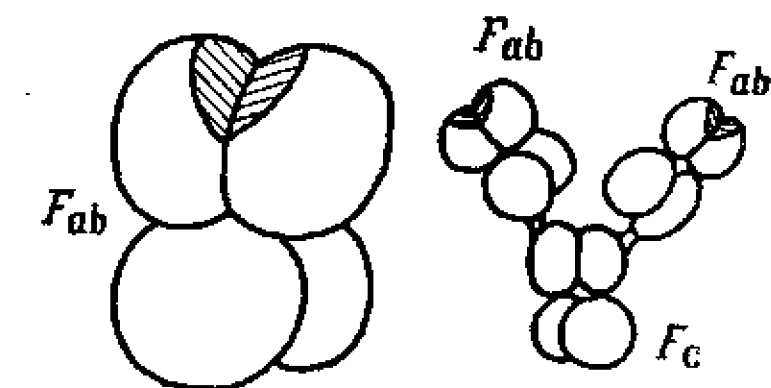
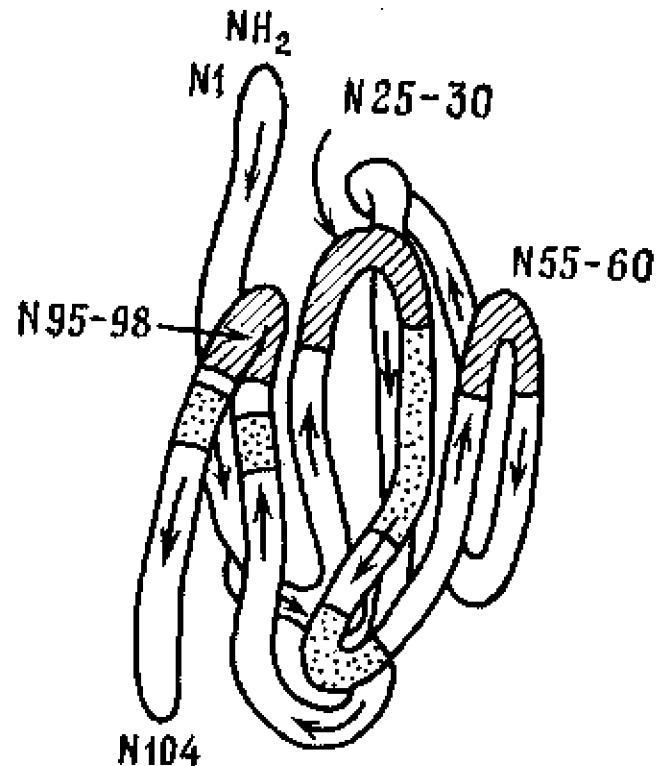


Рис. 26. Схемы пространственного расположения доменов фрагмента F_{ab} и молекулы IgG в целом
Области связывания антигенов заштрихованы

Рис. 25. Пространственная конфигурация V_H -петли IgG1

Гипервариабельные области заштрихованы; точками отмечены участки контакта с зеркально расположенной петлей V_L

что общий характер расположения полипептидных цепей одинаков у различных антител, а также у петель V_H и V_L каждого антитела.

На рис. 25 представлено пространственное расположение V_H -петли от NH_2 -концевой аминокислоты (№ 1) до 104-й. Образующий петлю полипептид оказался уложенным примерно параллельными складками без спирализованных участков. Замечательно, что при такой укладке все три гипервариабельные области оказались сближенными. Они как бы образуют участок некоей поверхности. Примерно такая же конфигурация характерна для остальных петель структуры обеих цепей иммуноглобулина. Точками на рис. 25 отмечены участки контакта V_H -петли с противолежащей ей V_L -петлей, пространственную конфигурацию которой можно себе представить как зеркальное отражение структуры, изображенной на рисунке. На участках контакта действуют гидрофобные, водородные и иные силы, связывающие цепи между собой. Можно заметить, что эти участки расположены примерно в одной плоскости.

Изображенная на рис. 25 пространственная конфигурация в целом представляет собой как бы полусферу («домен»). Две таких полусферы, V_H и V_L объединяясь по плоскостям контакта, образуют одну почти сферическую область. То же самое имеет место для областей C_H и C_L , только плоскость их контакта оказывается повернутой по отношению к плоскости контакта V_H и V_L . В целом получаются конфигурации, схематически изображенные на рис. 26 для фрагмента F_{ab} и всей молекулы IgG. На рисунке штриховкой отмечены концевые участки, куда входят гипервариабельные области V_H и V_L . Они образуют как бы площадку, точнее, род канавки или «ущелья», окаймленного выходом шести петель гипервариабельных областей. Оценены разме-

ры площадки — примерно $3 \times 1,3 \times 0,7$ нм. Можно ожидать, что это «ущелье» и является областью связывания антигена. Такое предположение нашло прямое подтверждение, после того как удалось кристаллизовать фрагменты F_{ab} одного из антител вместе со связанными с ними антигенными детерминантами — производными витамина K_1 . Фурье-анализ рентгенограммы показал, что молекула витамина лежит в «ущелье» области «узнавания», а различные ее части сближены и взаимодействуют с определенными аминокислотами в гипервариабильных областях V_H и V_L .

Из приведенных данных следует, что непосредственно область «узнавания» и связывания антигена образуют примерно 20 аминокислот. Однако, по имеющимся оценкам, еще не менее 70 аминокислот участвуют в определении пространственной конфигурации этой области.

Неоднозначность иммунного ответа

В качестве сил взаимодействия между участвующей в связывании частью поверхности антигена («антигенным детерминантом») и аминокислотами области связывания могут, по-видимому, выступать все те же водородные, гидрофобные и ван-дер-ваальсовы силы. Существенно здесь то, что контакт осуществляется одновременно по нескольким точкам. Только совместному действию упомянутых слабых сил в этих точках можно приписать удержание молекулы антигена в комплексе с антителом. Отсюда и вытекает условие «узнавания» — стерическое соответствие конфигураций антигенного детерминанта в области связывания антитела, обеспечивающее возможность многоточечного контакта. Очевидно, что единичные или немногочисленные замены аминокислот хотя бы в одной из гипервариабильных областей антитела или в детерминанте антигена могут катастрофическим образом нарушить такое соответствие. Это — предпосылка высокой избирательности «узнавания» антигена антителом.

Но здесь же, как это ни парадоксально, кроется и возможность нарушения избирательности узнавания. Во-первых, совокупность сил взаимодействия, способных удержать антиген, есть понятие количественное. Вполне возможно, что в отсутствие контакта в одной из точек при общем соответствии конфигураций и наличии контактов в остальных точках силы взаимодействия могут оказаться еще достаточными для удержания антигена. А это означает, что антитело может слегка «ошибаться» в «узнавании» антигена, допуская некоторые вариации в структуре последнего. Кроме того, можно себе представить, что одно и то же антитело способно осуществить соответственный контакт с двумя совершенно различными антигенами: в качестве точек контакта могут быть использованы разные совокупности аминокислот гипервариабильных областей антитела и различные аминокислоты или иные функциональные группы антигена. Иными словами, описанная система «узнавания» содержит в себе как возможность вы-

сокой избирательности «выбора» антигена антителом, так и определенную вероятность ошибки такого выбора, вытекающую из возможности осуществления нескольких узнающих структур в одной комбинации $V_H - V_L$.

Есть и другой аспект проблемы однозначности иммунного ответа организма. На поверхности почти любого антигена существует несколько совокупностей возможных точек связывания с антителами (антигенных детерминантов), отличающихся друг от друга. Каждая из этих совокупностей может быть «узнана» своим специфическим антителом; таким образом, иммунный ответ организма на введение одного антигена может состоять в одновременной выработке нескольких видов антител. Это положение подтверждается тем фактом, что ИЭФ иммунной сыворотки выявляет иногда целый ряд полос, в каждой из которых находятся антитела, способные связывать один и тот же антиген. Такое положение еще увеличивает вероятность ошибочного «узнавания» некоторыми из этих антител других антигенов, отличающихся от того, которым был стимулирован иммунный ответ.

Вообще надо заметить, что специфичность иммунной сыворотки — эффект популяционный. Эта специфичность подразумевает синтез целого ряда различных антител, объединенных тем общим признаком, что все они способны связывать один и тот же антиген, которым было иммунизировано животное. Однако, помимо него, они в принципе могут связывать и некоторое число других, отличающихся друг от друга антигенов.

Все изложенное не имеет своей целью дискредитировать исключительные возможности использования иммунологических подходов для идентификации заранее выбранных белков. Следует лишь иметь в виду некоторую вероятность ошибки, обусловленную неоднозначностью иммунного ответа. К счастью, такая вероятность достаточно мала, поскольку в реальной ситуации анализируемая смесь биологических макромолекул содержит сравнительно небольшое число антигенов.

Описанная картина позволяет понять причины и границы так называемых «перекрестных» иммунных реакций, когда антитела, выработанные в ответ на введение в организм одних антигенов, например определенных белков, «узнают» и связывают родственные, хотя и не идентичные белки, например, полученные от животного другого вида.

Здесь уместо упомянуть, что антитела и сами могут выступать в качестве антигенов как в гетерологичной системе, т. е. при введении их в организм животного другого вида, так и в гомологичной — например, при инъекции мышам инбредных линий. При гетерологичной иммунизации в качестве антигена (иммуногена) доминирует F_c -участок молекулы антитела. При гомологичной иммунизации антитела вырабатываются к F_{ab} -фрагментам. Показано, что антигенными детерминантами в этом случае служат гипервариабельные области V_H и V_L или прилегающие к ним участки цепей. Даже для близкородственного организма они мо-

гут оказаться чужеродными, если в исходном, донорном организме они были выработаны в ответ на введение постороннего антигена, с которым акцепторный организм контакта не имел. Иммунизация описанного вида называется идиотипической, а сама возможность использования антиген-связывающего центра антител в качестве антигенного детерминанта для синтеза других антител в близкородственном организме носит название «*идиотипии*».

Отметим также, что хотя способностью к полноценному «узнаванию» и связыванию антигена обладает только целый F_{ab} -фрагмент, но некоторое слабое специфическое связывание обнаруживают и изолированные тяжелая и легкая цепи IgG (при этом надо принять специальные меры для растворения обычно нерастворимой изолированной тяжелой цепи).

Синтез и сборка молекул иммуноглобулинов

Показано, что синтез H- и L-цепей в плазматических клетках происходит независимо. Генетический анализ обнаруживает, что их гены не сцеплены между собой. Полисомы, синтезирующие тяжелые цепи, состоят из 11—18 рибосом, а полисомы, ведущие синтез легких цепей, — из 4—5. Легкая цепь синтезируется примерно за минуту, а тяжелая — вдвое дольше. Вариабильные и неизменные области каждой из цепей кодируются отдельно. Объединение информации для синтеза этих областей в мРНК для целой L- или H-цепи происходит на уровне ДНК. Удалось выделить мРНК, кодирующую всю L-цепь целиком и способную вести синтез ее *in vitro*. Оказалось, что с 3'-конца она несет участок поли(А) длиной в 200 остатков и содержит две нетранслируемые вставки: одна из них, протяженностью в 150 нуклеотидов, расположена вблизи 5'-конца молекулы перед началом последовательности, кодирующей область V_L , а вторая, длиной в 200 нуклеотидов, лежит между концом области C_L и поли(А)-последовательностью. Функции нетранслируемых участков неизвестны. Возможно, что они обеспечивают трансляцию этой мРНК именно в мембраносвязанных полисомах, что необходимо для секреции иммуноглобулинов. Как правило, хотя и не всегда, синтез L- и H-цепей в плазматических клетках сбалансирован, видимо, также на уровне транскрипции.

Сборка полной четырехцепочечной молекулы иммуноглобулина занимает от 5 до 15 мин. Показано, что для одного из IgG мыши сначала объединяются две H-цепи, образуя структуру H_2 , а потом к ним присоединяются две L-цепи. Для IgM порядок иной: сначала образуются двухцепочечные комплексы вида HL, а затем они объединяются в зрелую структуру вида H_2L_2 . Этот порядок, видимо, зависит от того, какие S—S-связи прочнее: между H-цепями или между L- и H-цепями. Соотношение прочностей этих связей можно установить при последовательном восстановлении целой молекулы иммуноглобулина путем обработки

ее постепенно возрастающей концентрацией β -меркаптоэтанола. Предполагается, что взаимная ориентация цепей иммуноглобулинов в клетке плазмацита сначала устанавливается за счет гидрофобных взаимодействий, а уже потом они сшиваются S—S-мостиками.

Полимеризация молекул IgM и IgA происходит в процессе их секреции. Организующую роль здесь, по-видимому, играет специальная полипептидная «J-цепь». Образование S—S-мостиков, связывающих мономерные молекулы между собой, ведет некий «фермент дисульфидного обмена». В присутствии этого фермента и J-цепи сборка пентамеров IgM и димеров IgA может происходить и *in vitro*. Процесс этот высокоспецифичен: IgM и IgA могут собираться одновременно, не давая гибридных форм.

КЛЕТКИ МИЕЛОМЫ И ГИБРИДОМЫ

Рассмотренные замечательные результаты тонких исследований строения иммуноглобулинов и особенно механизмов их биосинтеза в плазмацитах вряд ли были бы возможны, если бы не одно крайне благоприятное для исследователей обстоятельство. Нормальные лимфоидные органы слишком гетерогенны по своему клеточному составу, чтобы предоставить подходящий материал для таких исследований. К счастью, была обнаружена замечательная модельная система, созданная самой природой. Путем последовательных трансплантаций у мыши можно образовать миеломную опухоль, состоящую целиком из плазмацитов, к тому же, в отличие от нормы, интенсивно пролиферирующих (делящихся).

Каждая опухоль — результат многократного деления одной исходной неопластической клетки, поэтому миелома представляет собой клон плазмацитов, секретирующих один-единственный гомогенный иммуноглобулин. На этих опухолевых клеточных линиях и был изучен синтез различных иммуноглобулинов (различие определяется специфичностью исходной клетки).

Новые колоссальные возможности для иммунохимических исследований появились в последние годы, когда было обнаружено, что соматические гибридные клетки, полученные от слияния *in vitro* клеток миеломы с другими клетками-продуцентами антител, наследуют от первых способность пролиферировать, а от вторых — способность к синтезу специфических для них антител. Таким образом, миеломные клетки передают гибриду свою способность делиться и вести интенсивный синтез иммуноглобулинов, в то время как генетическая информация для этого синтеза поступает от обеих клеток — миеломной и ее партнера по гибриду. Такие гибридные клетки («гибридомы») могут размножаться *in vitro*, вырабатывая большие количества антител. Их можно размножить и путем трансплантаций в организме мыши. Мало того, удастся отобрать такие исходные варианты миеломы или такие продукты гибридизации, что синтез собственных мие-

ломных иммуноглобулинов оказывается заблокированным и вся «миеломная» продуктивность выражается в массивном синтезе интересующих исследователя *моноклональных*, т. е. совершенно одинаковых не только по своей специфичности, но и по первичной структуре, антител. Трудно переоценить значение этого открытия для развития иммунохимии и исследовательских методов на ее основе. Подробнее методы получения гибридом и моноклональных антител рассмотрены ниже.

ПОЛУЧЕНИЕ ИММУННОЙ СЫВОРОТКИ И ОЧИСТКА АНТИТЕЛ

Иммунизация кролика

Иммунизация в лабораторных условиях начинается с введения в организм подопытного животного раствора антигена. Самое детальное описание не может заменить практического освоения этой процедуры под руководством опытного оператора. Здесь надо показывать, а не рассказывать. Поэтому следующие замечания имеют целью только обрисовать общую картину соответствующих манипуляций, с тем чтобы читатель, никогда их не наблюдавший, мог составить себе хотя бы приближенное представление об используемых здесь приемах.

Кролик чаще других лабораторных животных используется в роли донора иммунной сыворотки. Имея в виду круг проблем, рассматриваемых в этой книге, ограничимся случаем выработки антител против чисто белковых антигенов. Получение иммунной сыворотки против пептидов и низкомолекулярных химических соединений (гаптенов) требует предварительной конъюгации этих антигенов с белком, для чего обычно используют бычий сывороточный альбумин. Конъюгацию осуществляют с помощью глютарового альдегида, карбодиимидов, дифтординитробензола и других бифункциональных агентов. Для пептидов, например, подробное описание конъюгации и иммунизации можно найти в одной из недавних работ [Walter et al., 1980].

Кровь у кролика удобно отбирать из крупной вены, идущей вдоль края уха. Тем же путем можно вводить антиген, если иммунизацию проводят непосредственно в кровоток. Шерсть можно не сбривать, но для раздражения уха следует потереть его ватным тампоном, смоченным бензолом или ксилолом, а затем смыть спиртом. Стерильную иглу калибра 22 или 25 вводят по направлению тока крови. Кролика во время этих операций можно уложить на спину и привязать за лапы к примитивному станку — наклонно стоящей доске с треугольным вырезом для головы. Многие кролики позволяют провести отбор крови из ушной вены, спокойно сидя на коленях у оператора. Отбирают кровь через резиновую трубочку, надетую на иглу, иногда с подсосом. При введении в вену белкового раствора из шприца подачу жидкости осуществляют медленно, в течение примерно 5 мин.

Возможны различные варианты иммунизации через кровоток. Например, вводят 0,5%-ный раствор белка три раза в неделю, увеличивая объем инъекции от первой к пятой неделе в следующем порядке: 0,5; 1,0; 1,5; 2 и 3 мл. Кровь берут на 8-й день после последней инъекции. Иногда в ходе иммунизации кролик погибает. Кроме того, интенсивность иммунного ответа у разных особей различна. Ввиду этого антиген следует вводить параллельно трем—пяти животным.

Более надежна иммунизация посредством подкожных инъекций. Опубликовано множество прописей, и цитировать их нет смысла. Каждая иммунологическая лаборатория имеет свой опыт и традиции в этом вопросе. При первой инъекции к раствору антигена добавляют равный объем полного адьюванта Фрейнда (см. ниже).

Некоторые авторы рекомендуют вводить антиген в смеси с адьювантом (подкожно) одновременно в область затылка (0,4 мл) и в обе задние лапы близ ахиллесова сухожилия (по 0,3 мл). В последние годы часто практикуется рассредоточенная подкожная инъекция — одновременно в 20 местах на спине животного. При введении раствора кожу следует слегка оттянуть так, чтобы игла под ней свободно перемещалась. Вводят раствор медленно, кожу смазывают иодом, но шерсть не выстригают — она предохраняет место инъекции от охлаждения, что способствует всасыванию антигена. Иногда, в случае необходимости экономии антигена, используют микровариант иммунизации с введением по 10—50 мкл 5%-ного белкового раствора по приведенной выше схеме в подушечки всех четырех лап кролика. Эту операцию производят с помощью шприца Гамильтона. Она очень болезненна и требует анестезии. В любом варианте иммунизация занимает несколько недель.

Так называемый «неполный адьювант Фрейнда» представляет собой смесь трех частей легкого минерального масла, одной части безводного ланолина и четырех частей 0,15 М фосфатного буфера. В состав «полного адьюванта Фрейнда» входят также микобактерии (например, авирулентная или убитая туберкулезная палочка) в конечной концентрации 10 мг/мл. Адьювант следует использовать в виде свежеприготовленной эмульсии. Эмульгирование осуществляют перемешиванием на большой скорости или многократным пропусканием через тонкую иглу шприца. Операцию эту повторяют и при смешивании адьюванта с раствором антигена, который добавляют понемногу, иногда с подогревом до 37°.

Использование адьюванта Фрейнда, как правило, весьма заметно увеличивает интенсивность иммунного ответа. Этот эффект приписывают раздражению и стимулированию местного воспаления ткани, что приводит, с одной стороны, к мобилизации и пролиферации макрофагов, а с другой — к образованию отека и замедлению рассасывания и поступления антигена в кровоток. В какой-то степени этим имитируется нормальная скорость раз-

множения инфицирующих агентов при заражении. Во время повторных, усиливающих ответ инъекций антигена адъювант не добавляют (или добавляют неполный адъювант). При любых вариантах иммунизации белок растворяют в стерильном 0,15 М растворе NaCl. Сам белок можно не стерилизовать — внесение небольшого количества микроорганизмов в процессе иммунизации для кролика не опасно.

Приготовление антисыворотки

Перед началом иммунизации отбирают небольшую порцию крови для приготовления нормальной контрольной сыворотки. Кровь отбирают и в ходе иммунизации для наблюдения за ростом содержания иммунных антител. Когда это содержание становится достаточным, из ушной вены берут кровь для приготовления антисыворотки (40—50 мл). В тот же день можно ввести кролику очередную порцию антигена, а через восемь дней — снова брать кровь. Затем следует дать животному отдохнуть в течение четырех недель. После этого достаточно одной инъекции антигена, для того чтобы содержание в крови нужных антител восстановилось на прежнем уровне. Таким образом, удастся использовать одного иммунизированного кролика в течение года. Некоторые исследователи предпочитают брать кровь у кролика прямо из сердца, осторожно вводя в него длинную иглу 18-го калибра. В норме кролик после этого остается жив.

О способах контроля за содержанием («титром») антител в сыворотке крови сказано ниже. Сыворотку получают, давая взятой крови свернуться в течение 30 мин и затем удаляя сгусток центрифугированием. Если из сыворотки нужно убрать комплемент, то ее прогревают в течение 30 мин при 56°. Белки комплемента при такой обработке денатурируют, а антитела ее выдерживают.

Обогащенную нужными антителами сыворотку крови (антисыворотку) хранят в лиофилизированном или замороженном (при -20°) виде. Антитела при замораживании и оттаивании не утрачивают своей активности. Однако если они были переведены в фосфатный буфер, то замораживать надо по возможности быстро, так как при замерзании этот буфер проходит фазу сильнонокислой эвтектики, поскольку двузамещенный фосфат кристаллизуется раньше, чем однозамещенный. Такое закисление может инактивировать антитела.

Для защиты от микрофлоры в антисыворотку или раствор антител можно добавить до 0,1% азиды натрия или до 0,01% мертиолата.

Очистка иммуноглобулина типа IgG

Очистку антител начинают с отделения IgG от прочих белков антисыворотки, в том числе и от остальных иммуноглобулинов. В тех случаях, когда нет необходимости в получении моноспеци-

фических антител, этим и ограничиваются. Очищенная фракция IgG содержит в этом случае и все нормальные антитела, находившиеся в сыворотке животного до иммунизации, но значительная часть ($\sim 10\%$) молекул IgG представляет собой специфические антитела, выработанные в ответ на введение использованного для иммунизации антигена.

Отделение суммарной фракции IgG начинают с фракционирования сывороточных белков сульфатом аммония (СА). Напомним, что глобулины отличаются от альбуминов именно тем, что они нерастворимы в водном растворе СА, концентрация которого составляет 50% от насыщающей. Поэтому очистку начинают с осаждения глобулинов, для чего в антисыворотку добавляют сухой СА до концентрации 50% от насыщения (примерно до 2М), осадок растворяют и операцию осаждения СА повторяют еще раз. Соль из вновь растворенного осадка удаляют диализом или гель-фильтрацией. Нередко для лучшей очистки проводят осаждение меньшей концентрацией СА (33% от насыщения), для чего к данному объему антисыворотки добавляют половинный объем насыщенного раствора СА и эту операцию после растворения осадка в воде повторяют 3—4 раза. Разумеется, за улучшение очистки при этом приходится расплачиваться некоторым уменьшением выхода IgG.

Используется и такая процедура фракционирования: антисыворотку подкисляют уксусной кислотой до pH 5,5, затем добавляют СА до 33% от насыщения, выдерживают 18 ч на холоду, центрифугируют и осадок отбрасывают. В этих условиях IgG остается в растворе, из которого его осаждают, увеличив концентрацию СА до 50% от насыщающей. Осадок промывают тем же раствором СА, перерастворяют и диализуют против нейтрального фосфатного буфера.

Из суммарной фракции глобулинов IgG отделяют хроматографически с помощью ДЭАЭ-целлюлозы, DEAE Sephacel или ДЭАЭ-сефадекса А-50. Колонку с ионообменником уравнивают 0,01—0,0175 М фосфатным буфером, pH 6,5—6,6. В этом же буфере наносят и элюируют глобулины. IgG не адсорбируется на колонке и выходит в первых порциях элюата. Остальные глобулины, в том числе и прочие иммуноглобулины, задерживаются ионообменником. Их можно затем поочередно элюировать. Например, IgA снимают с колонки 0,08 М фосфатным буфером, а IgM — 0,3 М буфером при том же pH. Можно вести очистку и в объеме, суспендируя ионообменник в растворе глобулинов (в том же буфере) при объемном соотношении 1 : 5. Суспензию выдерживают с периодическим перемешиванием в течение часа при 4°, после чего обменник промывают на стеклянном фильтре несколькими порциями буфера. При очистке IgG из сыворотки человека лучше использовать 0,01 М фосфатный буфер, а при очистке IgG кролика — 0,0175 М буфер. Для предотвращения последующей агрегации белка буфер подтитровывают с помощью 1 М K_2HPO_4 до pH 7,5.

Следует иметь в виду, что за счет различия состава гипервариабельных областей IgG не вполне гомогенны по заряду и иногда могут элюироваться в довольно широком диапазоне концентраций буфера, порой даже перекрываясь с другими глобулинами. Однако в большинстве случаев ограничиваются описанной выше простейшей процедурой хроматографической очистки.

Очищенная таким образом антисыворотка полиспецифична (поливалентна), хотя может быть и очень сильно обогащена антителами одной определенной антигенной специфичности. Если этого недостаточно, то для дальнейшей очистки моноспецифических антител используют иммуносорбенты.

Прежде чем описывать используемые при этом приемы, обратим внимание на то, что необходимое условие получения узкоспецифического иммунного ответа — совершенная чистота белка-антигена, используемого для иммунизации. Эта чистота должна отвечать иммунологическим, а не электрофоретическим критериям. Последние для данной цели не адекватны: в одной полосе при электрофорезе могут оказаться несколько различных белков и, наоборот, один чистый антиген может иногда дать несколько полос, если он существует в нескольких иммунологически равноценных конформациях.

Достаточным критерием иммунологической чистоты белка можно считать образование только одной полосы преципитации при двойной радиальной иммунодиффузии (см. ниже), когда с испытуемым очищенным белком взаимодействует поливалентная антисыворотка, полученная в ответ на введение животному неочищенного белка. Здесь уместно напомнить, что даже идеальная очистка белка-антигена не гарантирует строгой однозначности иммунного ответа. У разных особей данного вида животного введение одного и того же, совершенно чистого антигена может вызвать различные иммунные ответы. В одном случае это может быть гиперпродукция практически гомогенной специфической популяции антител, в другом — ответ может оказаться поливалентным, так что в антисыворотке появится целый набор антител, способных связывать исходный антиген (но не только его). Этот набор иногда можно разделить электрофорезом или ИЭФ. О причинах поливалентного иммунного ответа было подробно сказано выше. Ввиду такой возможности иммунизацию, как уже упоминалось, следует проводить параллельно на нескольких животных, с тем чтобы иметь возможность выбора наиболее «чистой» моноспецифической антисыворотки. После этих необходимых замечаний можно рассмотреть заключительный этап очистки антител — использование иммуносорбентов.

Иммуносорбенты для очистки антител

Иммуносорбентами называют иммобилизованные антитела или антигены, сохранившие способность к образованию иммунных комплексов. Здесь нас будет интересовать вариант иммуно-

сорбента с иммобилизованным антигеном. При пропускании через колонку такого сорбента антисыворотки или частично очищенной фракции IgG он связывает и задерживает только специфические для данного антигена антитела. Все остальное, вообще говоря, можно отмыть буфером. Трудности, как мы увидим дальше, могут возникать из-за явления неспецифической сорбции белков на матрице сорбента, но есть средства для их преодоления. Специфически сорбированные и тем самым хорошо очищенные, антитела нетрудно снять с иммуносорбента путем диссоциации их комплексов с молекулами антигена при существенном изменении pH буфера или увеличении концентрации в нем соли.

Для приготовления антигенных иммуносорбентов используют два способа. В первом из них достаточно концентрированный раствор антигена превращают в пространственную сетку, сшивая молекулы белка между собой глутаровым альдегидом или другим бифункциональным агентом. Второй способ состоит в ковалентном связывании антигена с гидрофильной водонерастворимой полимерной матрицей типа полиакриламида, агарозы или сефадекса.

Для приготовления иммуносорбента с помощью глутаральдегида 750 мг белка-антигена растворяют в 10 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7. По каплям с перемешиванием добавляют 3 мл 2,5%-ного водного раствора глутаральдегида. Через 3 ч при комнатной температуре образуется гель. Его измельчают в гомогенизаторе на небольшой скорости вращения в 200 мл 0,2 М фосфатного буфера, pH 7,3. Суспензию центрифугируют и осадок отмывают тем же буфером с повторными гомогенизациями до прозрачности супернатанта ($A_{280} < 0,01$). Потом такую же промывку производят в 0,2 М глицин-HCl-буфере, pH 2,8 (буфер для элюции антител), и, наконец, в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7, содержащем 0,15 М NaCl (буфер посадки антител). Промытый сорбент смешивают в центрифужной пробирке с антисывороткой или раствором IgG в течение 30 мин, а затем оставляют на 1,5 ч при комнатной температуре. После этого сорбент осаждают центрифугированием (1000 g, 15 мин при 4°) и промывают тем же забуференным раствором соли до прозрачности супернатанта при 280 нм. Элюцию антител производят тоже в объеме тремя порциями по 5 мл буфера для элюции (pH 2,8) с промежуточными центрифугированиями при 6000 g в течение 15 мин на холоду. Объединенные элюаты для очистки от остатков геля фильтруют через стекловолокнистый фильтр и диализуют против 0,15 М NaCl. Гель можно регенерировать многократной промывкой 0,2 М фосфатным буфером, pH 7,3, и хранить на холоду с добавкой азиды натрия или мертиолата.

Для приготовления иммуносорбента на матрице удобно воспользоваться сефарозой, активированной бромистым цианом, которую выпускает фирма «Pharmacia» («CNBr-activated Sepharose 4B»). Обработка бромистым цианом создает на поверхности полисахаридной матрицы многочисленные активные центры, легко присоединяющие к себе белки ковалентными связями по их концевым аминок группам.

Продажный лиофилизированный препарат BгCN-сефарозы суспендируют в 1 мМ HCl, дают набухнуть в течение 15 мин и промывают тем же раствором от консервирующих добавок. Количество ее можно брать из расчета посадки 5—10 мг белка на 1 мл влажного сорбента с учетом того, что 1 г лиофилизированной сефарозы набухает до объема 3,5 мл.

После промывки обменник переводят в 0,1 М раствор NaHCO₃ (pH 8,3) с 0,5 М NaCl. Высокое содержание соли препятствует неспецифической сорбции белков на матрице сефарозы. В этом растворе обменник в течение 2 ч перемешивают с раствором антигена на качалке при комнатной температуре (или в течение ночи на холоду). Пользоваться для этой цели мешалками не следует ввиду истирания сефарозы. После окончания посадки антигена необходимо заблокировать не занятые им активные центры сорбента. Для этого гель обрабатывают таким же образом в 1 М растворе этаноламина или 0,2 М растворе глицина при pH 8. Затем избытки белка и блокирующего агента надежно отмывают тем же раствором бикарбоната с солью, потом 0,1 М ацетатным буфером (pH 4) с добавкой 0,5 М NaCl и снова бикарбонатом.

Приготовленный таким образом иммуносорбент переводят в 0,01 М фосфатный буфер (pH 7) с 0,15 М NaCl, заполняют им небольшую колонку, на которую и наносят антисыворотку или иммуноглобулины, растворенные в том же буфере. Колонку хорошо промывают фосфатным буфером, но с удвоенной концентрацией соли, а иногда и с добавкой 1—2% неионного детергента Тритона X-100 — все это для снятия неспецифически сорбированных белков. Элюировать антитела с колонки можно 0,1 М уксусной кислотой или 4,5 М раствором MgCl₂. Затем следуют завершающие операции нейтрализации, диализа и, если надо, концентрирования раствора очищенных антител. Колонку регенерируют, хорошо промывая посадочным буфером, и хранят на холоду с добавкой 0,1% азида натрия.

Если BгCN-активированная сефароза недоступна, то можно приготовить активированный сорбент и в лабораторных условиях на основе сефарозы 4В или сефадекса G-200. Например, к набухшей декантированной сефарозе приливают равный объем воды, погружают в нее термометр и электрод pH-метра, затем при непрерывном перемешивании постепенно добавляют измельченный BгCN из расчета примерно 200 мг на 1 мл исходного объема влажной сефарозы. Не следует забывать, что бромистый циан очень ядовит и работу с ним надо проводить в надежном вытяжном шкафу со всеми необходимыми предосторожностями. Суспензию непрерывно подтитровывают концентрированным раствором NaOH, поддерживая pH около 11. Одновременно, добавляя лед, не дают ей разогреваться выше 20°. Реакция заканчивается за 8—12 мин, о чем можно судить по прекращению закисления раствора. Активированная таким образом сефароза не очень устойчива при щелочных значениях pH. Ее следует незамедлительно перенести на стеклянный фильтр и хорошо промыть упомянутым выше NaCl-бикарбонатным буфером для посадки антигена.

При сравнительной оценке двух описанных вариантов приготовления иммуносорбента первый из них привлекает своей простотой и безопасностью, но следует иметь в виду, что глутаровый альдегид сшивает белки-антигены столь тесно, что взаимодействие с антителами происходит только на поверхности частиц раздробленного геля. У сефарозы и сефадекса такое взаимодей-

ствие происходит и внутри крупнопористых гранул сорбента. Иногда для увеличения свободы взаимодействия антител с антигенами последние «сажают» на активированную сефарозу не «вплотную», а через промежуточные линейные молекулы типа этилендиамина или еще более длинные и гибкие углеводородные цепи.

Следует отметить, что впервые иммуносорбенты на матрице были синтезированы и использованы А. Е. Гурвичем и соавторами еще в 1961 г. Диазопроизводное целлюлозы (из обычной ваты) было получено точно таким же способом, какой спустя 16 лет Олвин описал для приготовления столь популярной ныне диазобумаги — антигены ковалентно присоединяли к сорбенту по диазогруппам [Гурвич и др., 1961]. Иммунные сорбенты на основе диазоцеллюлозы с посадкой на нее как антигенов, так и очищенных антител успешно использовались, например, в опытах по изучению генетики иммуноглобулинов [Рохлин и др., 1970].

Для приготовления иммуносорбента необходимо иметь очищенный антиген. Если речь идет о препаративном получении специфических антител, то без этого, очевидно, не обойтись. Однако при очистке относительно небольшого количества антител можно ограничиться разделением исходного клеточного экстракта, например методом электрофореза, и отделять специфические антитела из антисыворотки по их связыванию с зоной (полосой или пятном) антигена в геле. Удобнее для этой цели использовать не сам гель, а его реплику на диазобумаге [Остерман, 1981], где антигены фиксируются ковалентно.

Олмстед фракционировал экстракт из клеток нейробластомы мыши электрофорезом по Лэммли и снимал реплику картины разделившихся белков на диазофенилтиоэфир-бумагу (ДФТ-бумагу). Для насыщения не занятых диазогрупп бумагу после этого инкубировали в 10%-ном растворе этаноламина и промывали буфером (0,05 М Трис-НСl, рН 7,5, с 0,15 М NaCl, 5 мМ ЭДТА, 0,25% желатина и 0,05% NP-40). Затем бумагу инкубировали в запаянном полиэтиленовом мешке в течение 12—16 ч при 37° с неочищенной антисывороткой (к тубулину) и промывали тем же буфером. Контрольную реплику с этого же геля обрабатывали аналогично, а затем инкубировали 2 ч при 37° с радиоактивно меченным белком А, избыток которого отмывали буфером, содержащим 1 М NaCl и 0,4% саркозила. Белок А, с которым мы подробно познакомимся ниже, специфически связывается с антителами. Это позволяет методом авторадииографии локализовать на реплике место связывания антител с нужным антигеном (его идентифицируют по положению полосы или пятна после электрофореза). Из рабочей реплики, не обработанной белком А, вырезали соответствующий участок и элюировали с него очищенные таким образом антитела кислым буфером (0,2 М глицин-НСl рН 2,8). Элюированный материал немедленно нейтрализовали щелочью, разбавляли фосфатно-солевым буфером и концентрировали ультрафильтрацией [Olmsted, 1981].

Получение моноклональных антител с помощью гибридом

В 1975 г. была опубликована пионерская работа Кёлера и Мильштейна, положившая начало новому этапу развития не только иммунологии, но, как ясно теперь, и всей биохимии — этапу, связанному с возможностями массовой продукции и использования моноклональных антител, синтезируемых особыми соматическими гибридными клетками — «гибридомами» [Köhler, Milstein, 1975].

Авторы отобрали линию миеломных клеток (РЗ-Х63 Ag 8), устойчивых к 8-азагуанину благодаря отсутствию у них фермента, способного вести синтез АМФ за счет прямого присоединения рибозофосфата к гипоксантину или гуанину. Этот фермент обеспечивает запасной путь синтеза АМФ в тех случаях, когда нормальная цепь ферментативных реакций такого синтеза заблокирована, например присутствием ингибитора аминоптерина. На питательной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (НАТ-среда), эти миеломные клетки не размножаются.

С другой стороны, авторы использовали клетки селезенки мыши, иммунизированной эритроцитами барана. Клетки селезенки не жизнеспособны в культуре — они тоже не размножаются (тем более на НАТ-среде). Далее с помощью убитого вируса Сендай осуществляли соматическую гибридизацию клеток миеломы и селезенки. На методе гибридизации с использованием вируса Сендай останавливаться не будем, поскольку его вытеснила описанная ниже более простая техника.

Гибридные клетки (гибридомы) отбирали по их способности размножаться на НАТ-среде. Присущая клеткам миеломы способность к быстрой пролиферации в этом случае восстанавливалась за счет привнесения клетками селезенки упомянутого фермента запасного пути синтеза АМФ. Этот этап селекции гибридных клеток играет ключевую роль ввиду очень малого выхода процесса гибридизации. Достоверность получения гибридом была подтверждена не только фактом их пролиферации на селективной среде, но и прямым анализом кариотипа этих клеток: было обнаружено почти суммарное число хромосом «родителей». Методом гемолиза было показано, что эти гибридомы образуют антитела к эритроцитам барана. Более того, путем селекции удалось отобрать такие штаммы гибридом, которые выделяли в питательную среду только эти «селезеночные» антитела и не синтезировали иммуноглобулинов миеломного происхождения. Используя изначально мышей линии BALB, авторы смогли путем инъекции отобранных таким образом гибридом мышам этой же линии стимулировать развитие у них злокачественных новообразований, ведущих к массивному синтезу антител к эритроцитам барана.

Разработанный Кёлером и Мильштейном метод немедленно получил широкое признание; в последние годы работы с исполь-

зованием гибридом появляются одна за другой. Для более подробной иллюстрации применяемой сейчас техники процитируем одну из них.

Катцман и соавторы получали моноклональные антитела к одному из белковых факторов коагуляции крови («фактор V») [Katzmann et al., 1981]. Мышей линии BALB/c иммунизировали, вводя им внутривенно 125 мкг фактора V, эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда. Через 10 дней так же вводили еще 125 мкг фактора V, на этот раз в солефосфатном буфере. Еще через 3 дня мышей забивали, стерильно извлекали селезенку и диспергировали ее клетки в питательной среде с добавлением до 10% сыворотки зародыша теленка. 10^8 клеток этой суспензии смешивали с 10^7 клеток культуры миеломы мыши (линия NS-1). Смесь осаждали центрифугированием и промывали питательной средой без сыворотки. К осадку клеток добавляли 1 мл 50%-ного раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ-1500) в той же среде (иногда используют смесь, содержащую 47% ПЭГ и 7,5% диметилсульфоксида [Voggebaeck, Etzler, 1981]).

В присутствии ПЭГ происходит соматическая гибридизация некоторой (небольшой) части клеток. В этом процессе важно строго следовать жесткому режиму времени соответствующих обработок. С 50%-ным раствором ПЭГ клетки инкубировали 1 мин при 37°. Затем добавляли еще 1 мл среды и осторожно перемешивали густую суспензию. Еще через 5 мин добавляли 20 мл той же среды и клетки собирали центрифугированием. Супернатант отсасывали и клетки осторожно суспендировали в 48 мл питательной среды с добавлением 10% сыворотки теленка, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и до 2 мМ глютамина. Суспензию разливали в две платы (по 24 лунки в каждой), куда вносили еще по 5×10^5 вспомогательных перитонеальных клеток («feeder cells»).

Через день инкубации начинали постепенный перевод клеток в селективную среду для отбора гибридом. С этой целью из каждой лунки удаляли по 1 мл указанной питательной среды и вносили на ее место по 1 мл точно такой же среды, но содержащей еще 0,1 мМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминоптерина и 16 мкМ тимидина (HAT-среда). Эту операцию повторяли через каждые 3 дня в течение 18 дней, постепенно заменяя тем самым нормальную питательную среду на селективную, в которой размножаться могут только гибридные клетки.

Далеко не все из них являются гибридами-продуцентами нужных антител (популяция клеток селезенки состоит не только из плазматитов), поэтому далее следовало сканирование всех лунок на наличие в их питательной среде антител к фактору V, что служило указанием на присутствие нужных гибридом. Сканирование производили методом радиоиммунного тестирования на твердой фазе. Подробно он рассмотрен в части III данной книги. Вкратце операции сканирования сводились к следующему. На поверхности пластинки из пластмассы (полистирола или полихлорвинила) сорбировали мономолекулярный слой антигена (фактора V) и осуществляли контакт этой пластинки одновременно со всеми лунками. Из тех лунок, где содержатся соответствующие антитела, последние частично переходили на пластину, связываясь с сорбированными на ней антигенами. Это можно было обнаружить, обрабатывая пластинку раствором радиоактивно меченных вторичных антител, например антисывороткой кролика против иммуноглобулинов мыши. Завершала сканирование автордиография или просчет кусочков соответственно разрезанной пластинки

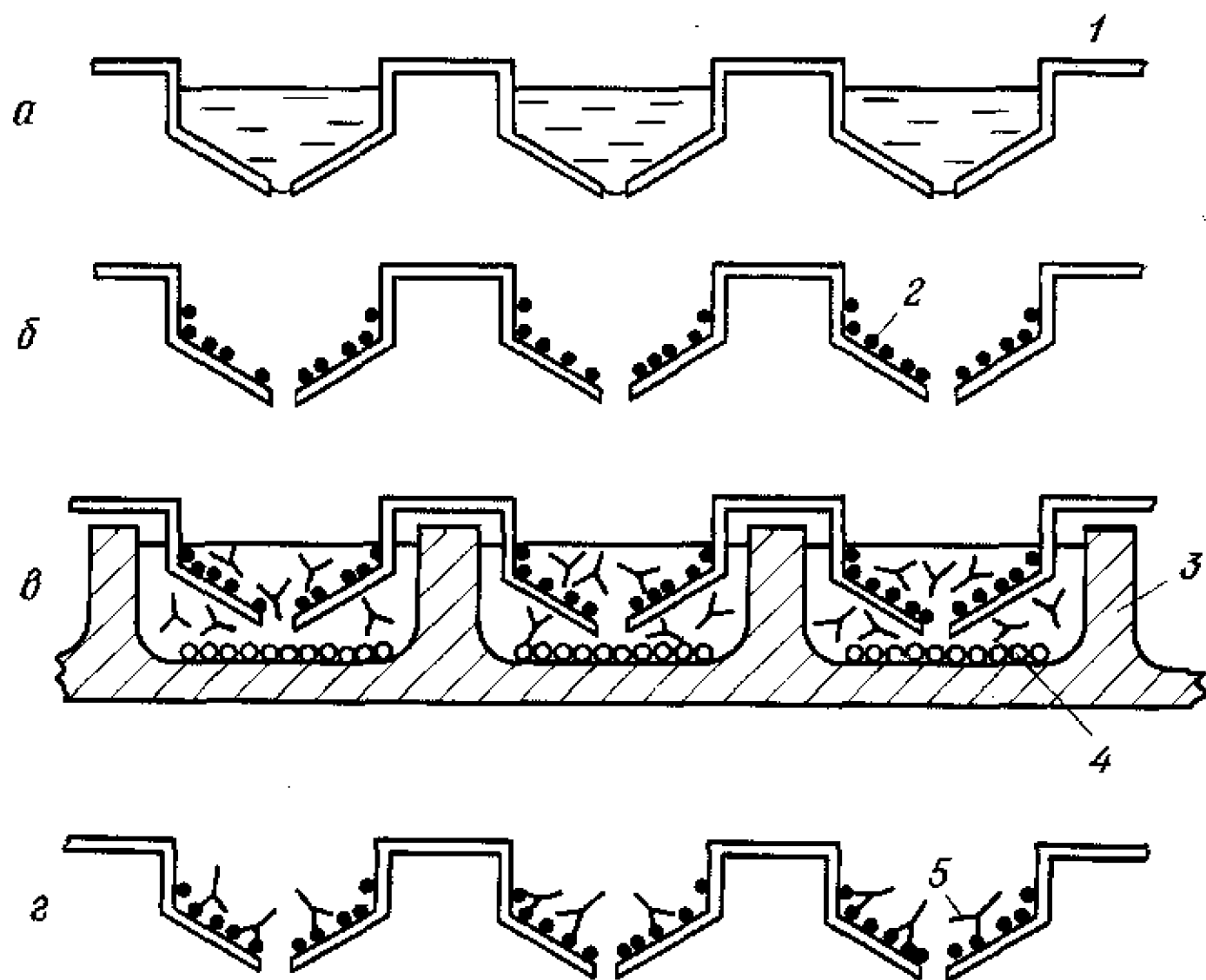


Рис. 27. Радиоиммунное сканирование для отбора гибридом, продуцирующих специфические антитела

1 — пластмассовая пластина, несущая конусы с отверстиями; 2 — молекулы антигена; 3 — иммунологическая плата с лунками; 4 — гибридомы; 5 — антитела; а — пластины, заполненные раствором антигена; б — антигены, сорбированные на поверхности пластмассы; в — погружение конусов в лунки и заполнение их питательной средой гибридом с находящимися в ней антителами; г — антитела, связавшиеся с антигенами на поверхностях конусов

В каждой из отобранных таким образом лунок еще содержалось около 200 000 клеток. В силу полиспецифичности иммунного ответа (см. выше) они еще не были моноклональными, поэтому далее клетки из этих лунок рассеивали по одной, выращивали колонии и снова их сканировали, т. е. производили обычные операции клонирования, позволяющие в конце концов отобрать наилучший по заданным параметрам клон гибридом, образующих совершенно одинаковые, «моноклональные» антитела. Моноклональные гибридомы в суспензии вырабатывают 5—10 мкг антител на 1 мл среды. Однако полученные от чистых линий BALB гибридомы сохраняют присущую миеломным клеткам способность к опухолевому росту. Ими инокулируют мышей и после нескольких пассажей получают в асцитной жидкости моноклональные антитела в огромном количестве — до 50 мг чистых антител на мышь (титр 10^6 — 10^7).

Упомянутую пластину для твердофазного радиоиммунного сканирования удобно изготовить с таким же, как у лунок, расположением конусов с малыми отверстиями (рис. 27, а). При внесении в них раствора тестирующих антигенов из-за гидрофобности пластика он через дырочки не выливается. Антигены сорбируются на стенках конусов, и жидкость, перевернув пластинку, можно просто стряхнуть (рис. 27, б). Затем конусы погружают в лунки. Питательная среда гибридом, содержащая

антитела, через отверстия входит внутрь конусов, и антитела получают возможность взаимодействовать с сорбированными антигенами (рис. 27, в). Далее пластину с конусами поднимают и жидкость снова стряхивают. На поверхностях конусов остаются иммунные комплексы (рис. 27, г). Теперь можно заливать в конусы раствор меченых вторичных антител (или меченого белка А — см. ниже), там же производить необходимые промывки и, наконец, разрезав пластину ножницами, просчитать радиоактивность, связанную с каждым из конусов, в счетчике γ -излучения [Eisenbarth, 1981].

В аналогичной работе, где получали моноклональные антитела против мембранных белков фибробластов зародыша мыши, для слияния клеток в гибридомы использовали раствор, содержащий 25% ПЭГ и 25% диметилсульфоксида [Hughes, August, 1981]. При сканировании гибридом в качестве твердой фазы использовали сами клетки фибробластов, сшитые в нерастворимый гель с помощью глутаральдегида. Недавно описано получение моноклональных антител к белкам 50 S субъединицы рибосомы *E. coli* [Shen et al., 1980].

В опубликованном недавно обзоре приводятся интересные сведения о получении моноклональных антител к ДНК и РНК. Они обладают высоким сродством к своим антигенам и довольно хорошей специфичностью: двунитевую ДНК «отличают» от однонитевой, а рибосомальную РНК «узнают» среди прочих РНК. Там же цитируется ряд работ, в которых были получены моноклональные антитела для опухолевых клеток, несущих на своей поверхности специфические опухолевые антигены. Антиопухолевые, радиоактивно меченные антитела могут быть использованы для поиска метастазов в организме, в том числе и у человека, поскольку в этом же обзоре приводится устное сообщение о получении продуктивных линий миеломы человека. Соединение моноклональных антиопухолевых антител с цитотоксинами может открыть новую страницу в борьбе со злокачественными новообразованиями. Получены также моноклональные антитела против ряда вирусов, в том числе вируса гриппа. В целом картина бурного развития приложений рассматриваемого метода всего лишь за 5 лет его существования производит сильное впечатление [Eisenbarth, 1981].

В работе Ли и соавторов содержатся первые данные о способности моноклональных антител к нуклеиновым кислотам различать нуклеотидный состав и даже последовательность нуклеиновых оснований; правда, эти данные получены на синтетических полинуклеотидах [Lee et al., 1981].

ПРОДАЖНЫЕ ПРЕПАРАТЫ АНТИТЕЛ

Ввиду того, что антитела очень устойчивы и хорошо хранятся в лиофилизированном виде, большое число фирм наладило их промышленное производство и поставляет широкий ассорти-

мент специфических антисывороток и очищенных антител. Особенно обширен ассортимент антисывороток у фирм медицинской специализации. Для биохимических исследований антисыворотки поставляют такие широко известные биохимикам фирмы, как «Sigma», «Bio-Rad», «Miles» и др. Предлагаемые ими списки антисывороток не столь обширны и менее специализированы, но все же слишком велики для того, чтобы их здесь цитировать. Приведем лишь несколько примеров наиболее употребительных материалов такого рода: антисыворотки кролика и козы против каждого из иммуноглобулинов человека, их тяжелых и легких цепей, фрагментов F_{ab} и F_c , белков комплемента и всевозможных белков крови человека, а также против гормонов; антисыворотки кролика и козы против иммуноглобулинов различных лабораторных животных, белков крови этих животных, эритроцитов, вирусов животных, целого ряда ферментов, лектинов и др.; очищенные IgG аналогичной специфичности, в том числе конъюгированные с флюоресцентной меткой (флюоресцеинизотиоцианатом), пероксидазой, щелочной фосфатазой, ферритином и т. д.

Особенно широкое применение продажные антисыворотки получили в качестве «вторичных антител», как описано ниже.

ОБНАРУЖЕНИЕ И ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИТЕЛ

Для контроля за ходом иммунизации животного и для планирования иммунохимических экспериментов необходимо располагать способом обнаружения и оценки содержания в антисыворотке антител, специфических к иммунизирующему антигену. Протекающая на молекулярном уровне реакция взаимодействия антител с антигенами должна приводить к развитию явлений, доступных наблюдению невооруженным глазом. Вовсе не обязательно, чтобы эти явления воспроизводили механизмы защитных реакций организма. Достаточно того, чтобы они определенно указывали на образование специфического иммунного комплекса.

Эту задачу удастся решить, опираясь на отмеченные выше факты множественности антигенных детерминантов на поверхности клеток и белковых молекул, а также на наличие двух областей связывания антигенов у каждой молекулы антитела. Можно приготовить такую смесь антител и антигенов в растворе, в которой в результате протекания иммунохимических реакций практически каждый из антигенов окажется связанным с двумя или несколькими молекулами антител, а каждое из антител, в свою очередь, свяжется с двумя антигенами (рис. 28, а). Образуется пространственная сетка чередующихся молекул антигенов и антител, легко выпадающая в осадок.

Очевидно, что для образования такого осадка (преципитации) концентрация обоих компонентов смеси должна быть достаточной. Менее очевидно, но легко понять, что и соотношение

их концентраций должно лежать в определенных границах. Действительно, если окажется, что антигены в растворе находятся в значительном избытке по отношению к антителам, то на долю каждого антитела заведомо достанется по два отдельных антигена и сетка не образуется (рис. 28, б). И наоборот, если в большом избытке будут антитела, то образование пространственной сетки окажется невозможным из-за нехватки связующих антигенов (рис. 28, в). Таким образом, даже при достаточной

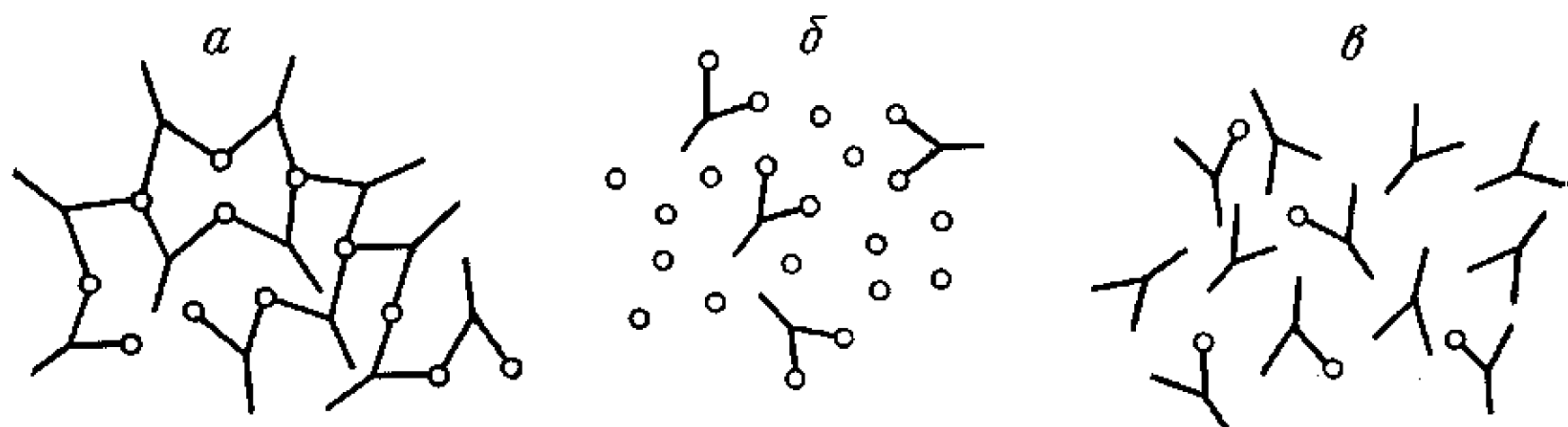


Рис. 28. Образование пространственной сетки молекул антител и антигенов (обозначены кружками)

a — эквивалентная концентрация; *б* — избыток антигенов; *в* — избыток антител

концентрации в растворе антигенов и антител их соотношение должно быть близко к оптимальному. Это соотношение, точнее некая область приемлемых для образования пространственной сетки соотношений концентраций антител и антигенов, называется «областью эквивалентности концентраций». Понимание необходимости такой эквивалентности очень существенно для дальнейшего изложения. Преципитация успешнее всего протекает вблизи нейтральных значений pH. При $pH < 4,5$ и $pH > 10$ преципитаты растворяются в результате диссоциации иммунных комплексов³.

Кольцевой тест

Простейшим, хотя и далеко не самым чувствительным, методом обнаружения в сыворотке крови иммунизированного животного специфических антител может служить так называемый «кольцевой тест». В нем как раз и используется явление преципитации пространственной сетки антигенов и антител.

Эквивалентное соотношение концентраций устанавливается за счет диффузии вблизи границы соприкосновения растворов антител и антигенов. В пробирку диаметром 3—4 мм наливают 0,1—0,2 мл антисыворотки. Если есть основание предполагать,

³ Преципитацию иммунных комплексов можно стимулировать полиэтиленгликолем. Например, после инкубации в течение 1,5 ч при комнатной температуре с 2,5% ПЭГ-6000 иммунные комплексы осаждают центрифугированием (2000 g, 10 мин) из раствора со стократным соотношением количества антигенов и антител при суммарной их концентрации 50 мкг/мл [Maidment et al., 1981]. По-видимому, в этом случае осаждение комплексов идет за счет обычной агрегации, а не путем образования пространственной сетки.

что в ней уже содержится много антител, то сыворотку разбавляют в 5—10 раз физиологическим раствором. Туда же можно добавить несколько кристалликов сахарозы, для того чтобы увеличить плотность раствора. Затем, наклонив пробирку, на сыворотку осторожно наслаивают примерно 0,5 мл раствора антигена. Нужно заранее приготовить несколько растворов антигена различной концентрации, проварьировав ее в достаточно широком диапазоне, например от 1 мкг/мл до 1 мг/мл, и столько же пробирок с антисывороткой.

Установив пробирки в штатив, наблюдают на темном фоне при боковом освещении образование мутно-белых колец преципитата. Кольца появляются в результате диффузии антител из сыворотки в раствор антигена — там, где создается эквивалентное соотношение концентраций, причем и абсолютные значения концентраций оказываются достаточными для образования пространственной сетки. Эти концентрации задаются разбавлением раствора антигена. Обычно кольца преципитатов образуются в пределах 20 мин. Если они не появляются в течение 2 ч, то это указывает либо на отсутствие или слишком малое содержание специфических антител в сыворотке, либо на неудачный выбор концентрации раствора антигена. Если в некоторых пробирках кольца преципитации появляются, то для количественных оценок следует приготовить серию дальнейших разбавлений антисыворотки, а для каждого из этих разбавлений новую серию разведений антигена, ориентируясь при этом на то соотношение их концентраций, при котором исходно наблюдалось появление колец.

Предельное разбавление антисыворотки, при котором еще удается наблюдать кольца преципитации (при подобранной оптимальной концентрации раствора антигена), характеризует содержание специфических антител в сыворотке; это разбавление называют «титром» антител. Таким образом, указание на то, что титр антител в антисыворотке равен 1000, означает, что при разбавлении антисыворотки крови иммунизированного животного в тысячу раз данный метод в указанных условиях позволяет обнаружить эти антитела по образованию колец преципитации. Очевидно, что эта характеристика — не строго количественная, ведь из нее нельзя вычислить количество микрограммов антител, содержащееся в одном миллилитре сыворотки. Однако для целей наблюдения за ходом развития иммунного ответа метод вполне пригоден. Из изложенного следует также и то, что указание титра антител в антисыворотке не имеет смысла без уточнения метода, которым этот титр определялся.

Определение соотношения эквивалентности

В описанном кольцевом тесте зона эквивалентности концентраций антител и антигена образуется за счет диффузии, и само это отношение концентраций (хотя бы выраженное через

разбавление антисыворотки) остается неизвестным. Если его необходимо определить, то подбор концентраций ведут в условиях смешивания двух растворов, наблюдая за выпадением преципитата по всему объему смеси.

В несколько пробирок наливают по 0,1 мл антисыворотки исходного, относительно небольшого разбавления. Затем в каждую пробирку приливают одинаковые объемы растворов антигена нарастающей концентрации, например от 20 мкг/мл и далее, удваивая концентрацию для каждой последующей пробирки. На этот раз содержимое пробирок взбалтывают и оставляют в термостате при 37°. Образование преципитатов обнаруживается по помутнению жидкости в некоторых пробирках. Отбирают одну или две пробирки, где преципитация выражена наиболее ярко. Теперь можно поварьировать концентрации антигена вблизи тех, которые были внесены в эти пробирки, с тем чтобы найти оптимум концентрации антигена. Иногда может оказаться необходимым взять другое начальное разбавление антисыворотки, чтобы изменение характера преципитации от пробирки к пробирке было более заметным.

По результатам такого подбора и устанавливают оптимальное соотношение разбавления антисыворотки и концентрации антигена (или тоже разбавления его из исходного раствора, например в тех случаях, когда антиген содержится в некоей физиологической жидкости). Оптимальное соотношение в определенных пределах не должно зависеть от абсолютных значений разбавления антисыворотки и концентрации антигена. Подвигаясь описанным способом к максимальному разбавлению антисыворотки, при котором помутнение смеси растворов еще удастся наблюдать, можно определить титр антител для этого варианта преципитации. Кстати, для упомянутого выше случая, когда раствор антигена представляет собой физиологическую жидкость с неизвестной абсолютной концентрацией антигена, последнюю тоже можно характеризовать максимальным разбавлением, при котором удастся наблюдать преципитацию, и соответственно ввести понятие титра антигена (определяемого выбранным методом).

В специальных исследованиях определяли абсолютные концентрации обоих компонентов иммунного комплекса. При этом удалось показать, что молярное соотношение антитело/антиген в условиях эквивалентности концентраций зависит от размеров белковой молекулы антигена. Для рибонуклеазы ($M=13\ 700$) оно равно примерно двум, для пепсиногена ($M=42\ 000$) — трем, а для γ -глобулинов ($M=146\ 000$) в оптимальных условиях с одной молекулой белка связывается в среднем 4—5 молекул антител. Очевидно, что это обусловлено наличием нескольких антигенных детерминантов на поверхности белка.

Гемагглютинация и гемолиз

Несравненно больше антигенных детерминантов, чем на белке, находится или может быть закреплено на поверхности целой клетки. Взаимодействие антител с этими поверхностными детерминантами, опять-таки в силу бивалентности антител, приводит к связыванию, или «агглютинации» клеток. Образование даже небольших клеточных агрегатов приводит к их быстрому и хорошо заметному осаждению из суспензии. Это обстоятельство позволило разработать столь же быстрый, как кольцевой тест, но на три порядка более чувствительный метод обнаружения антител в иммунной антисыворотке.

Для этой цели на поверхность промытых эритроцитов барана с помощью глутарового альдегида «сажают» в большом количестве молекулы белка-антигена. Их избыток в этом случае не опасен, так как они остаются связанными с клетками эритроцитов, а каждая такая клетка выступает в роли одиночного мультивалентного антигена. Выбор для этой цели именно эритроцитов связан с их окрашенностью, что облегчает наблюдение за осаждением агглютинатов. При смешивании разбавленной антисыворотки со взвесью таких эритроцитов даже ничтожной концентрации антител достаточно для возникновения заметной агглютинации. Она обнаруживает себя тем, что эритроциты не оседают на сферическое дно пробирки (или специальной лунки) в виде маленького сгустка, расположенного в центре полусферы, а выстилают ровным слоем всю ее поверхность.

Следует подчеркнуть, что антисыворотка должна быть свободна от комплемента. В противном случае произойдет вскрытие («гемолиз») эритроцитов. Белки комплемента не удаляют из сыворотки, а инактивируют нагреванием ее при 56° в течение 30 мин. Впрочем, можно поступать и прямо противоположным образом — судить о содержании в антисыворотке специфических антител по степени гемолиза, в присутствии комплемента, стандартной суспензии эритроцитов, «сенсibilизированных» посадкой молекул соответствующего антигена на их поверхность. Дело в том, что для литического действия комплемента на эритроцит не имеет значения, за счет какой иммунной реакции антитело связывается с его поверхностью. О степени гемолиза удобно судить по выходу гемоглобина в раствор, что легко оценить по оптической плотности этого раствора после удаления из него оставшихся целыми эритроцитов путем центрифугирования.

Реакция связывания комплемента

Участие комплемента в гемолизе эритроцитов можно использовать для определения концентрации антител (или антигенов) методом так называемой «реакции связывания комплемента». В этом случае нет нужды в посадке «рабочего» антигена на поверхность эритроцитов. Их используют в комплексе со своими, специфическими антителами, полученными из сыворотки друго-

го животного путем его иммунизации эритроцитами барана. Такой комплекс образуют заблаговременно и, разумеется, в отсутствие комплемента. При контакте с комплементом из любого источника (напомним, что белки комплемента неспецифичны) эритроциты будут немедленно разрушаться — пойдет гемолиз. Но содержание комплемента в некоем рабочем растворе можно поставить в зависимость от концентрации в нем иммунных комплексов антиген — антитело, причем уже не имеющих никакого отношения к эритроцитам. Содержание комплемента в рабочем растворе надо подобрать так, чтобы он был в недостатке. Тогда чем больше его свяжется с находящимися в растворе иммунными комплексами, образованными исследуемыми антителами и антигенами, тем менее полно пройдет гемолиз стандартной суспензии сенсibilизированных эритроцитов. Существенно, что при этом нет нужды в образовании пространственной сетки из молекул антител и антигенов, а следовательно, в определенном соотношении концентраций тех и других молекул. В принципе успех реакции не зависит и от абсолютных значений этих концентраций — они могут быть очень малыми. Все это обусловлено тем, что связывание комплемента протекает для каждого индивидуального иммунного комплекса антиген — антитело независимо от существования других таких комплексов.

Судить об уменьшении степени гемолиза стандартной суспензии эритроцитов можно по снижению (по сравнению с контролем) оптической плотности выходящего в раствор гемоглобина. Это снижение путем построения соответствующих калибровочных кривых можно связать либо с количеством вносимых в раствор антигенов при условии, что специфические к ним антитела в этом растворе имеются в избытке, либо с количеством вносимых антител в случае избытка антигенов. Для реакции связывания комплемента нет нужды выделять и очищать образующие комплемент белки. Достаточно воспользоваться нормальной сывороткой неиммунизированного животного. Такую сыворотку можно хранить в лиофилизированном или замороженном виде при -20° , но не просто на холоду, так как при длительном хранении сыворотки даже вблизи нулевой температуры комплемент постепенно инактивируется. Чаще всего используют сыворотку крови морской свинки (продажный препарат).

Микрореакция связывания комплемента была отработана еще 20 лет назад Вассерманом и Левином и с тех пор используется без существенных изменений. Например, для определения концентрации некоего антигена поступают следующим образом. В ряд пробирок разливают по 0,3 мл буфера, содержащего 5 мМ барбитуровой кислоты, 0,15 М NaCl, 0,5 мМ $MgCl_2$, 0,15 мМ $CaCl_2$ и 0,1% желатины. Затем туда же вносят по 0,1 мл соответственно (см. ниже) разбавленной антисыворотки к исследуемому антигену и (для построения калибровочной кривой) по 0,1 мл различных разбавлений исходного раствора самого

этого антигена. Затем в качестве источника комплемента в пробирки добавляют по 0,1 мл 0,4%-ного раствора лиофилизированной сыворотки морской свинки и инкубируют при 4° в течение 18 ч. Этого достаточно для полного завершения реакции образования иммунных комплексов и максимального связывания с ними комплемента. Наконец, в пробирки вносят по 0,1 мл суспензии сенсibilизированных, как описано выше, эритроцитов барана (продажный препарат) в концентрации примерно 5×10^7 кл/мл. Гемолиз завершается в течение часа при температуре 35°. Нелизированные эритроциты удаляют центрифугированием на холоду и измеряют оптическую плотность супернатанта при 413 нм (A_{413}). В контрольную пробирку антитела и антиген не вносят.

Концентрацию раствора сыворотки морской свинки и суспензию эритроцитов подбирают так, чтобы уже в контрольной пробирке комплемент был в некотором недостатке и гемолиз эритроцитов проходил менее чем на 100%. В рабочих пробирках гемолиз будет еще менее полным за счет связывания части молекул комплемента исследуемым иммунным комплексом. Разбавление антисыворотки надо выбрать так, чтобы концентрация антител была заведомо избыточной (не влияла на степень связывания комплемента), а калибровочную кривую следует строить как зависимость *уменьшения* поглощения гемолизата (ΔA_{413}) от концентрации раствора антигена. Количество антигена следует брать минимальным, с тем чтобы оставаться заведомо далеко от эквивалентного соотношения концентраций антигена и антител, когда образование пространственной сетки мешает связыванию комплемента. С помощью калибровочной кривой при точно такой же постановке эксперимента можно определить концентрацию антигена в исследуемом растворе, испробовав несколько его разбавлений и используя для измерений линейный участок кривой [Wasserman, Levine, 1961; Klinkert et al., 1980; Krajewska et al., 1980].

Точно так же, но при обратном соотношении компонентов иммунного комплекса производят определение концентрации антител.

Чувствительность методов прямой преципитации комплексов антиген — антитело и методов с участием эритроцитов и комплемента трудно даже сравнивать. Если первые позволяют обнаруживать антитела при концентрации не менее 20 мкг/мл, то геммагглютинация и гемолиз позволяют снизить порог чувствительности до 0,01 мкг/мл, а метод связывания комплемента — до 0,1 мкг/мл. Однако следует иметь в виду, что высокочувствительные количественные методы по своему существу (очень малые концентрации антител) не могут быть столь же быстрыми, как преципитация, и требуют многих часов для проведения соответствующих экспериментов. Если учесть, что концентрация специфических антител в антисыворотке при успешной иммунизации достигает 10 мг/мл, то ясно, что даже относительно низ-

кая чувствительность кольцевого теста более чем достаточна для контроля за ходом иммунизации, а простота и быстрота этого теста дают ему явные преимущества.

С этой точки зрения вряд ли имеет смысл использовать для контроля за развитием иммунного ответа и описанные ниже методы, основанные на диффузии и преципитации иммунных комплексов в гелях агарозы или агара, хотя это и встречается нередко в научной литературе. Чувствительность диффузионных методов того же порядка, что и для преципитации в жидкости. Возможность окрашивания преципитатов в геле дает относительно небольшой выигрыш в чувствительности, поскольку лимитирующим фактором является образование пространственной сетки преципитата. Вместе с тем, все диффузионные методы требуют много времени.

Иное дело, когда эти методы используются для определения гомогенности антисыворотки или моновалентности ее антител. Здесь методы диффузии и преципитации в геле имеют определенные преимущества ввиду возможности образования, фиксации и окраски нескольких независимых зон (полос) преципитации для разных пар антиген — антитело, обнаруживающих себя при сочетании обследуемой антисыворотки с растворами разных антигенов.

Метод Ухтерлони

Наиболее широко распространен метод двойной радиальной диффузии в геле, предложенный Ухтерлони [Ouchterlony, 1950].

1%-ным горячим раствором агарозы или 1,5%-ным раствором агара в 0,05—0,075 М Трис-барбитуратном (Трис-боратном или Трис-НCl) буфере (pH 8,0—8,6) с 0,1—0,15 М NaCl заливают обезжиренные, строго горизонтально расположенные стекла так, чтобы получить слой толщиной примерно 1,5 мм. В тех случаях, когда для растворения антигена использовали додецилсульфат натрия (ДДС-Na), в раствор агарозы добавляют до 1% неионного детергента Тритона X-100. Дело в том, что ДДС-Na даже в концентрации 0,05% заметно ингибирует образование иммунного комплекса антиген — антитело. Тритон X-100 связывает ДДС-Na в смешанные мицеллы и тем самым снимает ингибирование. Впрочем, даже если и нет ДДС-Na, то 0,5—1% Тритона X-100 или дезоксихолата натрия (ДОХ-Na) нередко добавляют в среду, где идет иммунная реакция, с тем чтобы уменьшить неспецифическую сорбцию белков на пространственной сетке преципитата. Образованию самих иммунных комплексов эти детергенты не мешают. В тех случаях, когда содержание ДДС-Na в растворе антигена очень велико, можно от него избавиться предварительно, например продолжительным центрифугированием исходного препарата на большой скорости в линейном градиенте плотности раствора сахарозы с добавлением 0,1—1% Тритона X-100. ДДС-Na снимается с белка, а образуемые им с Тритоном комплексные мицеллы всплывают к менис-

ку центрифужной пробирки [Bhakdi, 1980]. Кстати, в цитируемой работе было показано, что антигенные свойства большинства белков не страдают от временного комплекса с ДДС-Na.

В затвердевшем геле по шаблону вырезают центральное отверстие — «лунку», а вокруг него еще 4 или 6 лунок, так что расстояние между ними составляет 5—10 мм. Лунки вырезают трубочками с острыми краями диаметром 3—4 мм, а гель из них удаляют. Лунки заполняют до краев соответствующими растворами. Например, в центральную лунку наливают более или менее разбавленную антисыворотку, а в периферические — серию разбавлений исходного раствора антигена (рис. 29). Сыворотку и антиген разбавляют физиологическим раствором или тем же буфером. Это делается для подбора оптимального соотношения их концентраций (см. ниже). Затем пластинку помещают во влажную камеру. Иммунодиффузию ведут иногда на холоду, а иногда при комнатной температуре или в термостате при 37°. Она продолжается не менее суток, а порою и несколько дней. Полосы преципитата можно наблюдать и фотографировать во влажном геле на темном фоне при освещении пластинки снизу и сбоку. Они рассеивают свет и в прозрачном геле видны хорошо. Перед окрашиванием неосажденные белки вымывают в течение суток в двух — трех сменах 0,15 М раствора NaCl. Полосы преципитата можно окрашивать точно так же, как было описано ранее для электрофореза и ИЭФ белков [Huchzermeier et al., 1980].

Рассмотрим теперь сам процесс образования полос преципитации. Молекулы антител и антигена диффундируют из своих лунок радиально во всех направлениях. Их концентрации в геле убывают по мере удаления от лунок, но в любой точке они пропорциональны соответствующим исходным концентрациям. В какой-то точке, находящейся на прямой, соединяющей центры лунок антисыворотки и антигена, диффундирующие навстречу друг другу потоки антигенов и антител впервые встречаются. Вначале это не препятствует дальнейшей диффузии. Однако по мере возрастания концентраций в области перекрывания встречных потоков там образуется зона оптимального соотношения концентраций антител и антигена и начинается формирование преципитата. Это ограничивает дальнейшую диффузию в радиальном направлении, так как новые порции антител и антигена будут достигать этой зоны в том же самом оптимальном соотношении и тоже будут выпадать в осадок. Между противоположными лунками образуется полоса преципитата, постепенно удлиняющаяся симметрично в обе стороны.

Чем больше разбавление раствора антигена, тем ближе эта полоса располагается к его лунке и тем тоньше и четче сама полоса. Однако при чрезмерном разбавлении антигена осадок будет плохо заметен или не образуется вовсе, поэтому стараются подобрать оптимальное разбавление исходного раствора антигена. Для случая, иллюстрируемого рис. 29, таким разбавле-

Не разбавлено

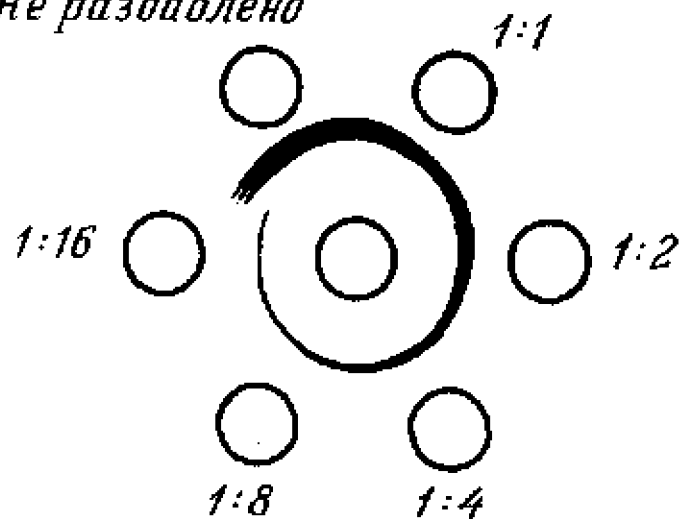


Рис. 29. Двойная радиальная иммунодиффузия (метод Ухтерлони)

Цифры у периферических лунок — разбавление исходного раствора антигена

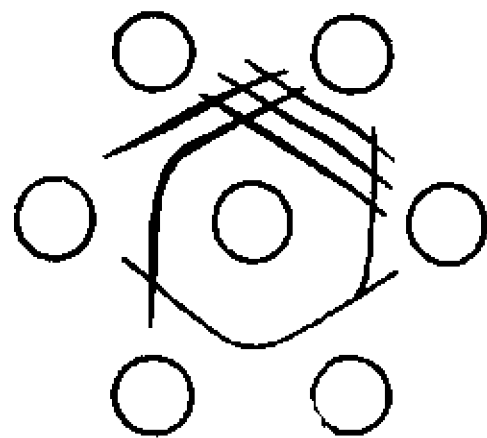


Рис. 30. Картины преципитации при двойной радиальной иммунодиффузии для различных антигенов и их комбинаций в периферических лунках

нием будет 1 : 8. Если тонкая и четкая полоса преципитации оказывается расположенной слишком близко к лунке антигена, то следует увеличить разбавление антисыворотки и подобрать его так, чтобы полоса передвинулась примерно к середине расстояния между лунками антисыворотки и антигена.

При неудачном подборе соотношения исходных концентраций антигена и антисыворотки (если эти концентрации достаточно велики) могут наблюдаться артефакты образования нескольких полос преципитации за счет попеременного осаждения и растворения иммунных комплексов. В таком случае описанную выше операцию подбора разбавления раствора антигена следует повторить для ряда разбавлений антисыворотки, вносимой в центральную лунку.

На рис. 29 показано, что одиночные полосы преципитации плавно переходят одна в другую. Такая картина характерна для случая, когда во всех периферических лунках находятся растворы одного и того же антигена. Если же в эти лунки вносить разные антигены, а в полиспецифической антисыворотке содержатся антитела для каждого из них, то полосы преципитации уже не будут переходить одна в другую, но, образуясь независимо, будут пересекать друг друга (рис. 30).

Возможен случай образования пересекающихся полос при испытании нескольких антисывороток к одному чистому антигену (его помещают в центральную лунку). Причина этого состоит в полиспецифичности иммунного ответа. В разных антисыворотках антитела, «узнающие» один и тот же чистый антиген (по его разным антигенным детерминантам), могут быть представлены в различных пропорциях.

В периферических лунках могут испытываться различные смеси антигенов, например при обследовании процесса очистки одного из них. Картина преципитации будет более сложной и может содержать несколько полос, часть из которых будет плавно переходить друг в друга, а часть — пересекаться (см. рис. 30).

Методом радиальной иммунодиффузии удобно характеризовать как чистоту раствора антигена, так и степень моноспецифичности антисыворотки (полноту очистки индивидуальных антител).

Описанная методика представляет собой микровариант метода Ухтерлони. Часто в качестве стекол для заливки геля используют предметные стекла микроскопа. В макрометод, описанном самим Ухтерлони, гель заливают в чашки Петри на толщину 2—3 мм. Лунки и расстояния между ними делают больше, соответственно увеличивают и объемы реагентов. Полосы precipitation видны лучше, но процесс диффузии занимает значительно больше времени.

Глава 2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ЗОН ПОСЛЕ ОБЫЧНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ИЭФ

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИГЕНОВ В САМОМ ГЕЛЕ

С помощью специфической антисыворотки можно идентифицировать полосу определенного антигена в геле агарозы или ПААГ после обычного электрофореза или ИЭФ. Простейший подход здесь сводится к вымачиванию геля в антисыворотке или растворе очищенных антител. Связываясь с антигенами, антитела увеличивают интенсивность последующей окраски соответствующих полос по сравнению с необработанным контрольным гелем. Кроме того, они могут осаждать антигены путем образования пространственной сетки, в то время как остальные белки остаются в растворе, поэтому их можно вымыть из геля. Разумеется, в тех случаях, когда электрофорез ведут в присутствии ДДС-На, последний надо предварительно диссоциировать от белков и удалить из геля, поскольку он, как уже упоминалось, препятствует образованию иммунных комплексов. При этом белки приходится фиксировать в геле осаждением кислотой и спиртом, что весьма затрудняет операцию их последующего вымывания из геля.

Так, Олден и Ямада вскрывали клетки гомогенизацией в 2%-ном растворе ДДС-На. Электрофорез вели в 5%-ном ПААГ, также в присутствии ДДС-На. Затем белки фиксировали кислотой и удаляли ДДС-На либо длительными промывками изопропанолом в смеси с уксусной кислотой, либо путем вытеснения, также из раствора кислоты, с помощью Тритона X-100. Оба варианта занимали много времени (4—5 сут). Затем гели переводили в нейтральный фосфатный буфер, содержащий 0,15 М NaCl (СФБ). Вырезанные вдоль геля полоски

(«треки») инкубировали с разбавленной тем же буфером антисывороткой во влажной камере в течение суток. Здесь не было необходимости заботиться об эквивалентном соотношении концентраций антител и антигенов, так как антитела взаимодействуют с разрыхленным при переводе в СФБ осадком антигена. Не связанные антителами белки вновь растворяли и вымывали из геля тремя сменами СФБ в течение 72 ч. Только после этого гель кратковременно вымачивали в 50%-ной ТХУ и окрашивали растворенным в ней красителем CBV R-250 [Olden, Yamada, 1977].

Более высокую чувствительность дает процедура двухступенчатой иммунохимической обработки. Дион и соавторы недавно использовали ее для установления иммунологического сходства одного из белков женского молока с основным гликопротеидом оболочки вируса рака молочной железы мыши.

Белки молока фракционировали электрофорезом в ПААГ по методу Лэммли после обработки их ДДС-На. В этом случае также проводили отмывку ДДС-На, но сравнительно кратковременную — в течение ночи смесью метанол — CH_3COOH — вода (50 : 7,5 : 42,5). Белки при этом осаждались. Затем гель переводили в СФБ (рН 7,4). Указанная отмывка не удаляет ДДС-На полностью, что снижает интенсивность первичной иммунной реакции, однако благодаря использованию двухступенчатой системы чувствительность в целом получается высокой.

Сначала гель инкубировали в течение ночи при 37° с разбавленной (1 : 10) тем же буфером антисывороткой козы против сопоставляемого вирусного гликопротеида. Затем не связавшуюся антисыворотку и все прочие белки молока растворяли и вымывали из геля с помощью СФБ в течение 3 сут. После этого гель инкубировали в течение 1,5 ч при 37° в растворе продажной антисыворотки кролика против иммуноглобулинов козы. Снова отмывали его от несвязавшейся сыворотки и белковые зоны окрашивали как обычно [Dion et al., 1980].

В этом варианте с белками зоны антигена сначала связываются специфические антитела сыворотки козы, а затем на них «вторым слоем» садятся антитела антисыворотки кролика. Последние «узнают» невариабельную часть (F_c) любого антитела сыворотки козы, поэтому то обстоятельство, что эти антитела своими вариабельными участками (F_{av}) связаны со специфическими антигенами, не мешает «узнаванию». Такую постановку эксперимента можно назвать «методом двух антител». Она широко используется в радиоиммунных методах исследования (см. часть III).

ПОЛУЧЕНИЕ ИММУННЫХ «РЕПЛИК»

Высокая чувствительность иммунохимических методов позволяет идентифицировать зоны антигена в геле, не связывая весь белок с антителами специфической антисыворотки. Для этой цели достаточно после окончания электрофореза или ИЭФ получить иммунную «реплику» с геля.

Агарозная реплика

На строго горизонтальную поверхность пластины ПААГ быстро выливают расплавленный 0,5%-ный раствор агарозы в СФБ, чтобы получить слой толщиной 1 мм. Предварительно агарозу смешивают при 56° с разбавленной специфической антисывороткой. После застывания геля агарозы такую двуслойную пластину выдерживают при 37° во влажной камере 2—6 ч, в зависимости от размера молекул антигена, диффундирующих из ПААГ в агарозу. Затем, отметив на пленке агарозы положение лидирующего красителя в рабочем ПААГ, ее снимают, покачивая пластинку в СФБ. Пленка агарозного геля легко отделяется от ПААГ. Одновременно с диффузией в гель агарозы идет иммунохимическая реакция антигенов с находящимися в геле антителами и образование преципитатов. Пленку вымачивают в течение 4 ч в том же буфере, удаляя из нее не прореагировавшие иммуноглобулины антисыворотки и белки неантигенной природы, перешедшие туда из ПААГ. Преципитировавшие иммунные комплексы с участием искомого антигена можно окрасить обычными способами или обнаружить методом автордиографии, если антиген или антитела несут радиоактивную метку. Отметим, что преципитация здесь требует подбора концентраций и довольно значительного времени диффузии антигенов в агарозу для обеспечения эквивалентного соотношения концентраций антител и антигена.

Радиоактивность в места преципитации иммунного комплекса можно ввести и с помощью меченого белка. А, как будет показано ниже. Воспользовавшись сделанной ранее отметкой для совмещения реплики и оригинала, нетрудно определить положение полосы искомого антигена среди прочих белков на электрофореграмме. Если эту полосу в геле желательно окрасить, то поверхность ПААГ следует предварительно протереть 1%-ным раствором ДДС-Na, для того чтобы удалить с нее адсорбированные белки сыворотки [Showe et al., 1976].

Реплика на диазобумаге

Вместо пленки агарозы белки из ПААГ или агарозного геля можно переводить на ДБМ-бумагу, введенную в практику биохимических исследований Олвином. Диазобумагу готовят, обрабатывая обычную фильтровальную бумагу *m*-нитробензилоксиметилпиридином при повышенной температуре. В результате этого нитробензильная группа присоединяется к бумаге. Затем нитрогруппу восстанавливают до аминогруппы обработкой гидросернистокислым натрием ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Так получают аминоксиметилбумагу («АБМ-бумагу»). Ее сейчас выпускает в готовом виде фирма «Collaborative Research» (США) под названием «Ultra Blot». Непосредственно перед использованием аминогруппу заменяют диазогруппой путем обработки нитритом натрия и соляной кислотой. Полученный материал носит назва-

ние «диазобумаги», или «ДБМ-бумаги» (диазобензилоксиметилбумаги). Подробное описание всей последовательности операций можно найти в оригинальной работе [Alwine et al., 1977]. По активным диазогруппам к бумаге ковалентно присоединяются белки.

После окончания электрофореза для освобождения от ДДС- Na пластину ПААГ вымачивают при комнатной температуре в течение часа в 0,15 М Na -фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl и 0,5% Тритона X-100. Затем гель кладут на стопку фильтров, смоченных тем же буфером, но без Тритона X-100, с верхней поверхности геля фильтровальной бумагой удаляют избыток влаги, кладут на него диазобумагу, затем несколько слоев сухой фильтровальной бумаги «Whatman 3MM», все это накрывают стеклом и прижимают грузом. За 1—2 ч при комнатной температуре, благодаря диффузии и вымыванию из геля поднимающимся вверх током жидкости («блоттинг»); часть белков из геля переходит на ДБМ-бумагу и связывается с ней в тех местах, которые лежат непосредственно над белковыми полосами в геле. Эта техника подробнее была описана при рассмотрении методов электрофореза [Остерман, 1981].

Затем следует насыщение неиспользованных диазогрупп, расположенных на участках между белковыми полосами. Для этого бумагу вымачивают 2 ч при 37° в 10%-ном растворе этаноламина в 0,1 М Tris-HCl (рН 9) с 0,25% желатины. Этаноламин по своей аминогруппе присоединяется ко всем оставшимся свободными диазогруппам бумаги и блокирует их.

Собственно иммунотестирование начинается тогда, когда полученную таким образом реплику белков геля на диазобумаге помещают в раствор специфической антисыворотки (например, в раствор с рН 7,4, содержащий 0,2 мг/мл IgG , 0,05 М Tris-HCl , 0,15 М NaCl , 5 мМ ЭДТА, 0,25% желатины и 0,05% NP-40) и осторожно покачивают в течение 12 ч при 37°. За это время завершается реакция связывания антител с фиксированными на бумаге антигенами (очевидно, что по крайней мере часть молекул антигенов не утратила своей иммунореактивности в результате фиксации на диазобумаге). Несвязавшийся IgG отмывают еще 12 ч при 37° тем же буфером. Здесь нет необходимости в эквивалентном соотношении концентраций, так как белки уже фиксированы на бумаге, так что антитела могут находиться в избытке.

Теперь для обнаружения оставшихся на бумаге антител, а следовательно, и локализации полос антигенов можно воспользоваться радиоактивно меченным (обычно ^{125}I) белком А из оболочек бактерий *Staphylococcus aureus*. В гл. 1 было упомянуто, что этот белок обладает сродством к неизменной части F_c большинства IgG . Некоторые подклассы иммуноглобулинов, например IgG1 мыши, не связывают белок А, поэтому возможность связывания надо проверять. Радиоактивно меченный белок А доступен в виде готового препарата. Метку несложно

ввести и в лабораторных условиях, как описано в следующей части книги. Немеченный белок А поставляется, например, фирмой «Pharmacia». У связанных с антигенами молекул IgG неизменная часть F_c остается свободной и сохраняет способность присоединять белок А. Таким образом, радиоактивный белок А связывается с диазобумагой только в местах расположения полос антигенов.

Иммунную реплику на диазобумаге инкубируют 2 ч при 37° в растворе ^{125}I -белка А (около 10^6 имп./мин в 1 мл). Затем тщательно отмывают водой и снимают неспецифически сорбированный белок А двукратной промывкой (по 2 ч) при 37° крепким солевым раствором с детергентом (1 М NaCl, 0,4% саркозила, 0,05 М Трис-HCl, 5 мМ ЭДТА, pH 7,4). Наконец, бумагу еще раз споласкивают водой, сушат и положение полос антигена локализуют методом авторадиографии с интенсифицирующим экраном (см. часть III).

Описанный метод был успешно использован для выяснения иммунологической близости РНК-полимераз I и II из цветной капусты. IgG очищали из антисыворотки кролика, иммунизированного РНК-полимеразой II. Электрофорезу в параллельных треках смешанного геля ПААГ-агарозы подвергали очищенные препараты обеих РНК-полимераз. В обоих ферментах были обнаружены иммуно-родственные субъединицы [Guilfoyle, 1980].

Аналогичный прием был использован недавно Саймингтоном и соавторами. Однако перенос белков из геля на диазобумагу они осуществляли не за счет вымывания, а электрофоретически — под действием электрического поля, приложенного в поперечном направлении, как было описано при обсуждении электрофореза. Авторы отмечают, что IgG и меченый белок А можно снять с реплики путем обработки ее в течение 30 мин при 60° раствором, содержащим 2% ДДС-Na и 0,1% β -меркаптоэтанола в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,5. Белки, закрепленные на диазобумаге, не теряют при этом своей реакционной способности, так что после соответствующей промывки бумаги их можно тестировать антисывороткой другой специфичности [Symington et al., 1981].

Еще более высокой избирательностью отличается постановка эксперимента в работе Эрлиха и соавторов. Они ввели еще одну ступень отбора антигенов. На ДБМ-бумагу из геля переводили не все белки, а преимущественно специфические антигены. С этой целью к диазобумаге предварительно присоединяли антитела к этим антигенам, точнее их фрагменты, содержащие оба центра связывания антигенов, но лишённые неизменной части F_c . В гл. 1 такие фрагменты были обозначены $F_{(ab')_2}$. Для их получения частично очищенную антисыворотку диализом переводили в 0,1 М CH_3COONa (pH 4,3) и в этом растворе обрабатывали пепсином (0,4 мг/мл) в течение 8 ч при 37° . «Отрезанные» таким образом фрагменты F_c' задерживали на им-

муносорбенте, несущем белок А, закрепленный на сефарозе («Protein A Sepharose 4В» — продажный препарат).

Неиспользованные после «посадки» $F_{(ab')_2}$ диазогруппы бумаги блокировали обработкой глицином и бычьим сывороточным альбумином. Когда после электрофореза белки из геля описанным выше приемом «блоттинга» переносили на диазобумагу, они уже не встречали свободных диазогрупп. Большинство из них, не задержавшись на бумаге, следовало дальше в лежащие сверху фильтры. Только антигены для закрепленных на диазобумаге

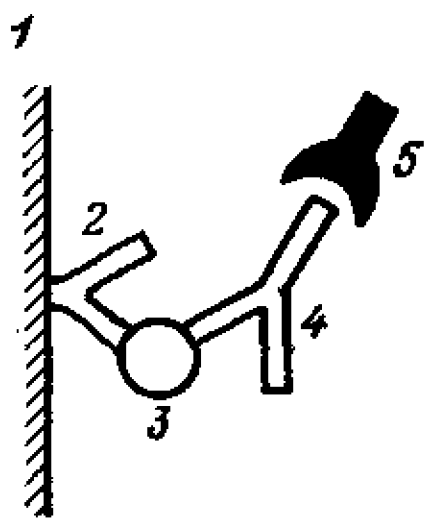


Рис. 31. Четырехслойная система обнаружения полос антигена с помощью реплики на диазобумаге

1 — диазобумага; 2 — фрагмент $F_{(ab')_2}$; 3 — антиген; 4 — антитело; 5 — $[^{125}I]$ -белок А

$F_{(ab')_2}$ -фрагментов оставались на бумаге, образуя иммунные комплексы. Затем диазобумагу еще раз обрабатывали той же самой иммунной сывороткой, но на этот раз полноценной, содержащей целые молекулы IgG. Эти молекулы по второму антигенному детерминанту связывались с белками-антигенами, «сидящими» на фрагментах $F_{(ab')_2}$, т. е. только на участках реплики, соответствующих первоначальному расположению полос антигена в геле. Прямая связь вторичных антител с диазобумагой осуществиться не может, так как все диазогруппы уже заняты или заблокированы. Но этот второй слой антител приносит свои F_c -фрагменты, а на них можно посадить радиоактивно меченный белок А, подобно тому как это было описано в предыдущем опыте. Получается сложный «сэндвич» (рис. 31). При образовании такого сэндвича специфическое «узнавание» антигена антителами происходит на двух этапах, что повышает степень избирательности. Метод легко обнаруживает 10^{-3} мкг белка-антигена в полосе. С его помощью авторам удалось обнаружить редуктазу дигидрофолиевой кислоты мыши, продуцируемую в клетках *E. coli*, несущих плазмиду с встроенным в нее соответствующим геном, причем уровень синтеза этой редуктазы не превышал 0,01% от уровня суммарного белкового синтеза в бактерии [Erlich et al., 1979].

Для облегчения перехода белков из геля на диазобумагу Ренарт и соавторы проводили электрофорез в растворимом ПААГ, сшитом диаллилтартардиамидом или этилендиакрилатом, полимеризуя его совместно с 1%-ной агарозой. Перед наложением диазобумаги ПААГ растворяли обработкой иодной кислотой или щелочью [Остерман, 1981]. Благодаря агарозе

пластина геля сохраняла свою форму, а выход белков из растворенного ПААГ через крупные поры агарозы заметно ускорялся [Renart et al., 1979].

Реплика на нитроцеллюлозном фильтре

Таубин и соавторы электрофоретически переводили белки из ПААГ на нитроцеллюлозный фильтр типа «Millipore» и там их обнаруживали иммунохимически [Towbin et al., 1979]. Для этого оставшиеся свободными центры сорбции нитроцеллюлозы сначала насыщали обработкой 3%-ным раствором БСА, а потом уже инкубировали с антисывороткой к интересующему белку. Иммуные комплексы на фильтре в этой работе обнаруживали с помощью радиоактивно меченных вторичных антител к иммуноглобулинам первого слоя (метод двух антител), а также конъюгированных с ферментами и флюоресцентно меченных антител (см. ниже.).

Недавно было показано, что после двумерного фракционирования 0,2 мг смеси белков по методу О'Фаррелла, выявившего около 400 пятен, описанный только что перенос можно осуществить последовательно на три нитроцеллюлозных фильтра, если силу тока переноса ограничить 300 мА, а продолжительность — одним часом. После обработки фильтров первичными антителами иммуные комплексы обнаруживали с помощью радиоактивно меченного белка А. При этом также использовали возможность снятия антител для последующей повторной обработки фильтра антисывороткой другой специфичности, однако вместо ДДС-На для этой цели применили вымачивание фильтра в течение 1,5 ч при комнатной температуре в кислой среде: 0,1 М глицин-HCl (pH 2,2) с 50 мМ KCl и 20 мМ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$. Фиксированные на нитроцеллюлозе антигены при этом не утрачивали своих иммунохимических свойств [Legoski, Verma, 1981].

Существенный недостаток нитроцеллюлозных фильтров при получении иммунных реплик — избирательный характер сорбции белков на этих фильтрах. Основные белки, как правило, сорбируются ими хорошо, а кислые иногда практически не сорбируются. Ввиду этого важного обстоятельства предпочтение следует отдать использованию диазобумаги. Кстати, отмеченная в последней работе возможность снятия нескольких реплик с одного геля, по-видимому, сохраняется и для этого варианта.

Следующий любопытный экспериментальный прием [Dausant, Mac Gregor, 1979] можно в какой-то мере рассматривать как процедуру, обратную описанную выше. В этой работе за счет иммунопреципитации антигены избирательно задерживали на кусочке обычной фильтровальной бумаги в процессе нанесения препарата на ПААГ для ИЭФ. Квадратик бумаги «Whatman» № 1» вымачивали в растворе очищенного IgG (2 мг/мл в 0,0175 М К-фосфатном буфере, pH 6,55) и клали на гель, а поверх него помещали кусочек такой же бумаги чуть меньшего

размера, смоченный раствором исследуемого белкового препарата. В параллельный трек вносили тот же препарат, но через бумажку, смоченную просто фосфатным буфером. После окончания ИЭФ и окрашивания белков сопоставляли наборы полос в двух соседних треках. «Лишние» полосы в контрольном треке, очевидно, принадлежали антигенам.

Глава 3

ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ ПО ГРАБАР И УИЛЬЯМС

В рассмотренном методе обнаружения антигенов после электрофореза в ПААГ путем их диффузии в слой агарозы иммунная реакция следовала за окончанием этой диффузии, когда снятую с ПААГ агарозную реплику вымачивали в специфической антисыворотке. Два процесса можно совместить во времени, если антисыворотку заставить диффундировать в гель навстречу диффузии антигена из белковых зон, полученных в результате электрофореза [Grabar, Williams, 1953]. При этом можно ожидать образования полос преципитации комплексов антиген — антитело, подобно тому как это имеет место при двойной радиальной иммунодиффузии по методу Ухтерлони. Для удобства наблюдения раствор антисыворотки следует заливать не сверху, а рядом с треком электрофореза, на некотором расстоянии от него, с тем чтобы оставалась свободная полоса ПААГ, где и будет происходить диффузия антигенов и антител навстречу друг другу. Поскольку расположение полос антигенов после электрофореза заранее неизвестно, антисыворотку, очевидно, придется заливать не в лунку, а в канавку, идущую вдоль всего трека. Кроме того, антисыворотку следует вносить в такую канавку только после окончания электрофореза, иначе преждевременная диффузия антител в гель может мешать завершению процесса электрофоретического фракционирования смеси белков.

Для ускорения диффузии электрофорез предпочитают вести в геле агарозы или агара. При анализе одного препарата можно воспользоваться предметным стеклом; для одновременного электрофореза трех — пяти препаратов (это удобно при подборе исходного разбавления белкового препарата и антисыворотки) используют квадратные стеклянные пластинки. Фирма «LKB» поставляет для этой цели пластинки размером 84×94 мм.

На горизонтально расположенную пластинку выливают расчетный объем расплавленного 1%-ного раствора агарозы (или 2%-ного агара) в 0,05—0,075 М Na-барбитуратном буфере (рН 8,6), так чтобы образовать слой геля толщиной 1—1,5 мм. Заготовленные впрок пластины можно хранить во влажной ка-

мере. Выбор рН здесь диктуется не только условиями электрофореза, но и оптимизацией условий иммунной реакции. Препарат обычно вносят в цилиндрическую лунку диаметром 2—4 мм. Такая форма лунки удобнее, чем прямоугольный колодец, для последующего процесса формирования дуг преципитации. Лунку располагают на расстоянии 2—3 см от катодного края пластины геля. Это расстояние обеспечивает формирование дуг преципитации (см. ниже) для антигенов, слабо мигрирующих в направлении анода, а также необходимо для компенсации «катодного дрейфа» всей картины фракционирования за счет эндосмоса (см. часть I). Эндосмос здесь не так опасен, как при ИЭФ. Достаточно, чтобы он был умеренным ($-m_r \leq 0,1$), но учитывать его надо; в случае значительного эндосмоса следует расположить лунку дальше от края пластины. Эндосмос в агаре всегда выше, чем в агарозе.

Если есть опасение, что некоторые белки, особенно щелочные, при рН 8,6 окажутся заряженными положительно и при электрофорезе будут мигрировать к катоду, то лунку препарата следует еще отодвинуть от края пластины. После окончания электрофореза, особенно если его ведут в агаре, нередко оказывается, что некоторые белковые зоны и соответствующие им дуги преципитации (см. ниже) располагаются со стороны катода по отношению к лунке; чаще это бывает не за счет положительных зарядов соответствующих белков, а в результате эндосмоса. Среди белков крови наиболее расположены к смещению в сторону катода иммуноглобулины, слабее других мигрирующие под действием электрического поля.

Для вырезания лунок используют такие же трубочки-штампы с отсосом геля, как и в методе Ухтерлони. В продаже имеются специальные телескопические трубочки-штампы для этой цели. Их присоединяют к водоструйному насосу. При вдавливании в гель сначала внутренняя трубочка с острыми краями вырезает лунку. Потом наружная трубка, которую в верхнем положении удерживает пружинка, опускается, перекрывает находящееся внизу отверстие, связывающее полость внутренней трубочки с атмосферой, и вырезанный гель отсасывается. Такое устройство несложно изготовить в лабораторной мастерской.

Одновременно с приготовлением лунок прорезают скальпелем продольные стороны канавок для антисыворотки, так чтобы ближайшая к будущему треку белков сторона канавки была от него на расстоянии 5—10 мм. Ширина канавки составляет 2—3 мм. До окончания электрофореза гель из канавки лучше не удалять в интересах сохранения однородности электрического поля во время электрофореза. Лунки и канавки удобно вырезать по шаблону из плексигласа (рис. 32). Показанные на шаблоне три отверстия в каждом треке предусмотрены для обоснованного выше выбора положения лунки для препарата. Использование шаблона позволяет обеспечить стандартность исходного положения лунок и ориентации канавок, что существенно для со-

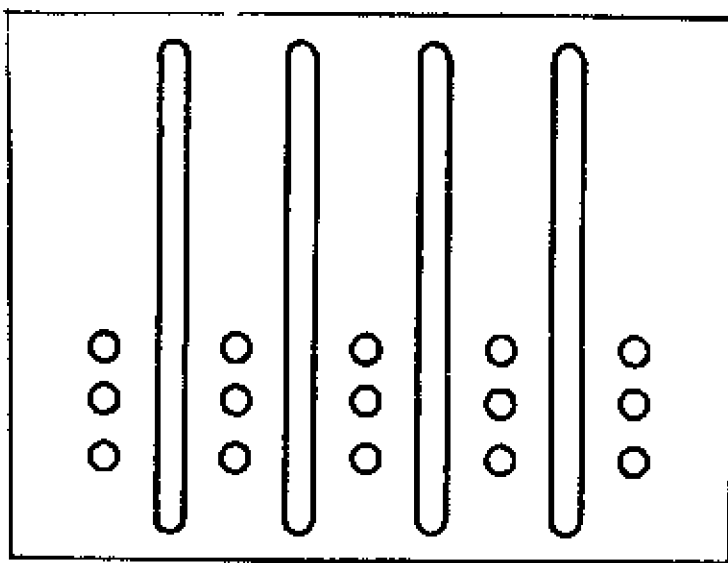


Рис. 32. Шаблон для вырезания лунок и канавок, используемый при иммуноэлектрофорезе в геле по Грабар и Уильямс

может варьировать в широких пределах (1—100 мкг) в зависимости от гетерогенности белковой смеси и эффективности образования иммунопреципитатов каждым из антигенов, входящих в ее состав. Это количество приходится подбирать в пробных экспериментах.

Затем проводят электрофорез в горизонтальной пластине геля, используя для этой цели один из приборов, описанных ранее [Остерман, 1981]. Положение геля можно фиксировать на охлаждающем столике прибора с помощью липкой ленты. Фитили электродов накладывают на гель, а полярность напряжения выбирают так, чтобы катод был со стороны лунки с препаратом. В качестве электродного обычно используют тот же буфер, что и в самом геле. При напряженности поля 10 В/см и температуре охлаждающей жидкости 10° электрофорез в геле агарозы занимает обычно 1—2 ч.

Затем следует этап иммунодиффузии и образования дуг преципитатов. Пластику с гелем вынимают из прибора и выскребают шпателем агарозу из канавок. Туда до уровня геля заливают разбавленную антисыворотку (степень разбавления, как указывалось, приходится подбирать). Если есть опасение, что гель агарозы неплотно прилегает к стеклу и антисыворотка может подтекать, на дне канавки следует предварительно образовать тонкий слой геля агарозы. После этого пластику оставляют во влажной камере на 10—20 ч.

За это время в свободные полосы геля по обе стороны от трека идет диффузия всех участвующих в электрофорезе белков из их конечных положений в геле. Благодаря круглой форме белковых пятен эта диффузия идет строго радиально и одинаково во всех направлениях. Навстречу им из канавок, расположенных обычно по обе стороны от трека белков, в ту же свободную полосу геля диффундируют все компоненты антисыворотки. Эта диффузия идет фронтально, одновременно (хотя и с неодинаковой скоростью) для всех антител, входящих в состав полифункциональной антисыворотки. Молекулы различных антигенов

поставления результатов параллельных экспериментов. Шаблон лучше класть не на гель, а с некоторым зазором на специальные уступы плоской формы, в которую, фиксированно по размеру, укладывают пластину с гелем. Фирма «LKB» для своих стандартных пластин предоставляет такие формы и набор разнообразных шаблонов к ним.

Препарат белков вносят в лунку микрошприцом на 2—10 мкл до ее заполнения. Суммарное количество белка в препарате мо-

встречаются со своими специфическими антителами против тех мест вдоль пластины геля, куда каждый из антигенов мигрировал в ходе предшествовавшего электрофореза. Там, где при такой встрече реализуется эквивалентное соотношение концентраций, а сами эти концентрации достаточны, идет образование полос преципитации иммунных комплексов, как это описано для метода Ухтерлони.

В данном случае полосы преципитации всегда имеют форму дуг, вогнутых в сторону белковых пятен и искривленных тем сильнее, чем ближе к пятну белка располагается полоса. Это расположение зависит от концентраций антигена в пятне и специфических для него антител в антисыворотке, а также от соотношения скоростей их диффузии в геле. Легко понять, что дуги преципитации должны быть неодинаковы по толщине, причем в двояком смысле этого утверждения. Во-первых, разные дуги могут существенно отличаться друг от друга по интенсивности, т. е. по обилию преципитатов. Это обусловлено различием концентраций антигенов в исходном препарате и антител в полиспецифической антисыворотке. Во-вторых, каждая из дуг окажется наиболее толстой в середине, а к концам ее толщина будет плавно уменьшаться (рис. 33). Причина этого состоит в том, что при радиальной диффузии концентрация антигена в геле уменьшается по мере удаления от исходного пятна, а его встреча с антителами будет происходить раньше всего в направлении, перпендикулярном к канавке, где и будет располагаться середина симметричной дуги преципитации. Положение концов этой дуги будет отвечать такому удалению от белкового пятна, когда эквивалентному соотношению концентраций антител и антигена отвечают столь малые абсолютные значения этих концентраций, что преципитат уже не может образоваться.

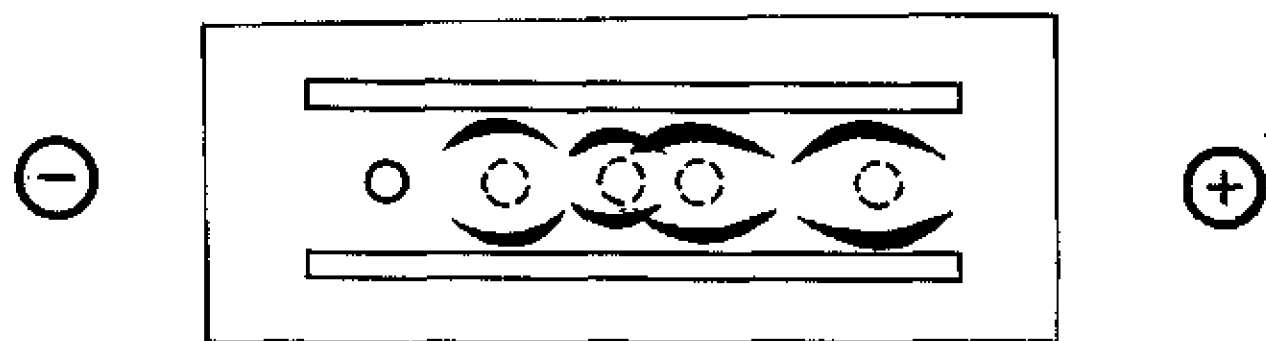


Рис. 33. Дуги преципитации иммунных комплексов после иммуноэлектрофореза смеси антигенов

В обе канавки внесена одна и та же полиспецифическая антисыворотка

На рис. 33 изображены две канавки, расположенные симметрично по обе стороны трека белков и заполненные одной и той же антисывороткой. В большинстве случаев так и поступают. Симметричная картина расположения дуг преципитации увеличивает надежность расшифровки результатов опыта. Впрочем, расшифровка в этом случае не означает определение содержа-

ния или характера миграции при электрофорезе определенного антигена. Она может быть полезной в сравнительных опытах для обнаружения отклонений от нормальной и хорошо изученной картины совокупности дуг преципитации, например для сыворотки крови или спинномозговой жидкости.

Для идентификации дуги преципитации, относящейся к определенному антигену, можно воспользоваться приемом, который иллюстрирует рис. 34. Полиспецифическую антисыворотку вносят в одну канавку, расположенную между двумя электрофоретическими треками. В одном из этих треков фракционируют исследуемую смесь антигенов, а во втором — проводят электрофорез чистого препарата искомого антигена. Теперь, опираясь на симметрию, можно среди суперпозиции дуг исследуемого препарата отыскать ту, которая обязана своим появлением наличию в препарате того же самого антигена. Кстати, суперпозиция и сложная порой картина взаимного пересечения дуг преципитации не должна вызывать недоумения, поскольку, как это уже отмечалось при обсуждении метода Ухтерлони, каждый из антигенов диффундирует и образует иммунные комплексы независимо от других. То же самое относится и к диффузии антител. Имеются и другие варианты использования описанного метода иммуноэлектрофореза.

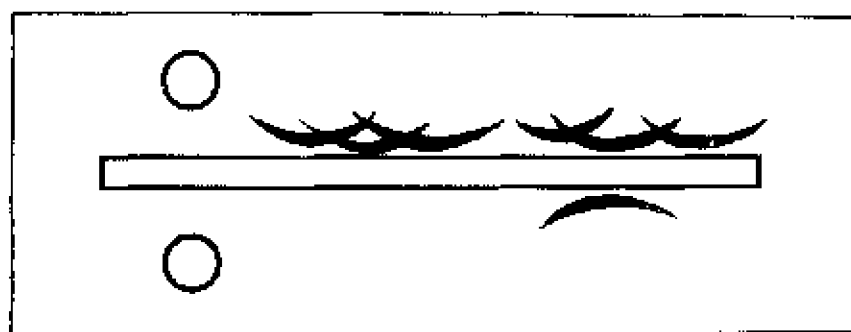


Рис. 34. Идентификация одного из антигенов после иммуноэлектрофореза смеси (см. текст)

Наиболее интенсивные дуги преципитации видны во влажном геле и без окраски. Для получения более детальной картины иммунопреципитации гель окрашивают одним из используемых при обычном электрофорезе красителей для белков [Остерман, 1981]. Предварительно из геля удаляют непреципитировавшие белки. Для этого его промывают несколько раз по 15 мин 0,1 М NaCl. Одновременно из пластины геля постепенно отжимают влагу, накладывая на нее каждый раз один слой влажной и пять слоев сухой фильтровальной бумаги, которые прижимают стеклом с лежащим на нем грузом в 1 кг. Наконец, гель сушат в струе теплого воздуха до состояния тонкой пленки и окрашивают, как описано в части I для ИЭФ в пластинах геля агарозы.

На рис. 35 представлена иммуноэлектрофореграмма белков человеческой сыворотки, полученная с помощью полиспецифической антисыворотки кролика к сыворотке человека. Можно заметить, что дуги преципитации в левой части рисунка вытянуты вдоль поля. Это указывает на совокупность нескольких белков, обладающих одинаковыми антигенными свойствами, но

разделяющихся при электрофорезе; в данном случае — это совокупность иммуноглобулинов.

Иммуноэлектрофорез очень широко используется в исследовательской практике. Среди недавних публикаций можно назвать, например, проверку полноты очистки фермента [Nuchzerteier et al., 1980] или выяснение иммунологического сходства двух ферментов [Gustafson, Milner, 1980].

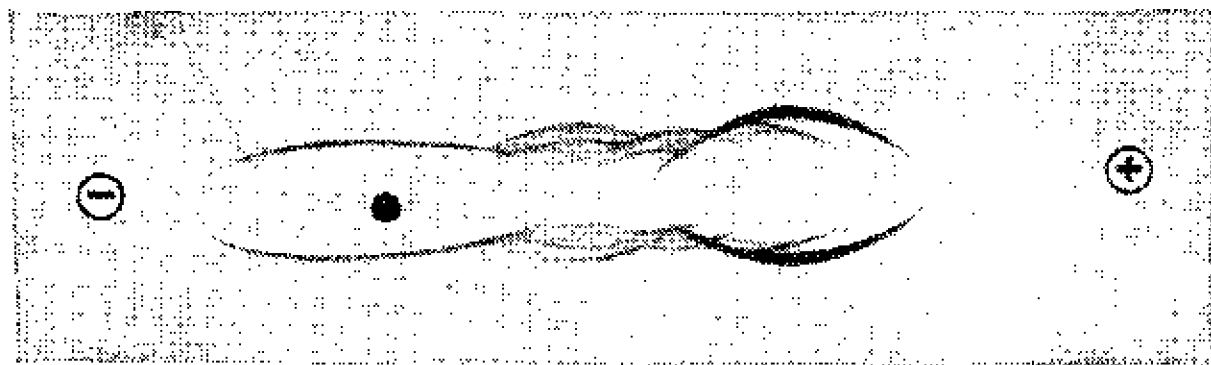


Рис. 35. Иммуноэлектрофореграмма белков сыворотки крови человека, полученная с помощью полиспецифической антисыворотки кролика

2 мкл разбавленной вдвое сыворотки человека разделяли в течение 1 ч при напряженности поля 10 В/см и 10°; иммунодиффузия — в течение 15 ч

Для разделения антигенов вместо электрофореза можно воспользоваться ИЭФ. Такая замена описана еще в 1978 г. [Weiss et al., 1978]. В то время еще не выпускалась агароза со слабой способностью к эндосмосу, пригодная для ИЭФ. Авторы были вынуждены воспользоваться 4%-ным ПААГ, что приводило к значительному увеличению продолжительности иммунодиффузии (до 3 сут). Использование названных в части I специальных марок агарозы для ИЭФ делает иммуноэлектрофокусирование столь же доступным методом, как иммуноэлектрофорез. Впрочем, высокая разрешающая способность ИЭФ имеет в этом случае и обратную сторону. Независимо от формы лунки белки будут фокусироваться в виде узких полос, поэтому дуги преципитации будут, очевидно, иметь менее удобную для расшифровки форму.

Глава 4

ЭЛЕКТРОИММУННЫЙ АНАЛИЗ ПО ЛОРЕЛЛУ

Это — количественный метод определения концентрации антигена [Laurell, 1966]. Раствор белка-антигена заливают в лунку, вырезанную на краю пластины геля агарозы с введенной в него антисывороткой. Под действием электрического поля белок мигрирует в этом геле. В ходе миграции образуются иммунные комплексы, связывающие антиген. Миграция продолжается до полного исчерпания антигена — по расстоянию миграции можно судить о его количестве. Это расстояние доступно наблюдению

благодаря образованию иммунопреципитата на переднем фронте миграции, как подробно описано ниже.

Стеклянную пластину заливают расплавленным 1%-ным раствором агарозы в 0,075 М Na-барбитуратном буфере (рН 8,6), содержащем 0,2—0,6 мМ лактата кальция и 0,02% азиды натрия, так чтобы получить слой геля толщиной 1 мм. Перед заливкой при 48—50° в раствор агарозы вносят антисыворотку до концентрации 0,5—10% по объему или соответственно меньшее количество очищенных антител и хорошо перемешивают. О подборе концентраций антисыворотки (и антигена) будет сказано ниже. Гель должен надежно пристать к стеклу, иначе антиген при электрофорезе будет мигрировать в слое свободной жидкости по зазору между стеклом и гелем. Ввиду этого имеет смысл предварительно нанести на подогретое стекло тонкий слой 1%-ного водного раствора агарозы, дать ему затвердеть, а потом высушить при 70°. Фирма «ЛКВ» предлагает пластины из специально обработанного пластика, с которым гель агарозы связывается прочнее, чем со стеклом.

Размер пластины зависит от числа одновременно обследуемых препаратов или разбавлений одного препарата с учетом того, что по крайней мере четыре лунки надо предусмотреть для известных концентраций антигена, по которым можно будет построить калибровочную кривую. Таким образом, вдоль края пластины в геле вырезают не одну, а несколько цилиндрических лунок диаметром 3—4 мм, отстоящих друг от друга на 8—10 мм и расположенных примерно на таком же, строго одинаковом для всех, расстоянии от края пластины. Лунки, как и ранее, вырезают по шаблону с помощью штампов с отсосом геля. У фирмы «ЛКВ» такие шаблоны предназначены для тех же стандартных пластин размером 84×94 мм. Нередко для опытов используют стеклянные слайды размером 5×5 см.

В лунки вносят по 5—10 мкл растворов антигена, содержащих обычно от 0,5 до 5 мкг белка. Объемы жидкостей, вносимых во все лунки, должны быть одинаковыми. Сначала пластины помещают в прибор для горизонтального электрофореза, заполняют тем же буфером электродные отсеки, накладывают фитили электродов так, чтобы катод был со стороны лунок, и выполняют все прочие подготовительные операции для электрофореза [Остерман, 1981]. Затем уже вносят растворы антигена в лунки и немедленно (во избежание простой иммунодиффузии) включают напряжение.

Электрофорез ведут в течение 3—18 ч в зависимости от количества антигена и его электрофоретической подвижности в геле при рН 8,6. Напряженность электрического поля должна составлять 10—20 В/см при обязательном охлаждении столика прибора до 4—10°. Выбор рН буфера продиктован стремлением свести до минимума электрофоретическую миграцию антител, заплавленных вгель агарозы.

В ходе электрофореза имеет место следующая цепь событий. Под действием электрического поля первые порции антигена покидают лунку и начинают мигрировать в геле по направлению к аноду. У переднего, полукруглого по форме фронта миграции образуется зона эквивалентного соотношения концентраций антигена и антител, что приводит к выпадению преципитата. Однако с подходом к этому месту новых порций антигена, поступающих из лунки, эквивалентность соотношения нарушается и за счет избытка молекул антигена преципитат растворяется. Это отнюдь не означает разрушения иммунных комплексов — они лишь снова переходят в раствор. В них остаются связанными все антитела, содержащиеся в данном участке геля, и часть антигенов, поступивших из лунки. Иммунные комплексы если и мигрируют в электрическом поле, то замедленно. Между тем, находящиеся в избытке свободные молекулы антигенов продолжают миграцию с прежней скоростью. Фронт свободных антигенов продвигается дальше, образуя новую, более удаленную от лунки зону эквивалентности и преципитации.

Принципиальное отличие от рассмотренных ранее процессов встречной иммунодиффузии по методу Ухтерлони и иммуноэлектрофореза состоит в том, что здесь концентрация антител в геле остается неизменной, в то время как там в зоне преципитации она увеличивалась за счет встречного потока диффундировавших в геле антител. Этим обеспечивалось поддержание эквивалентного соотношения концентраций в зоне преципитации, а следовательно, и ее неподвижность. Продвижение фронта преципитации в методе Лорелла продолжается вплоть до полного исчерпания запаса антигена, расходуемого на образование иммунных комплексов вдоль всего пути миграции. После этого фронт преципитации останавливается, а его расстояние от лунки может служить мерой количества антигена, исходно в ней находившегося.

В результате тепловой диффузии молекул антигена в обе стороны перпендикулярно направлению электрического поля боковые контуры треков движения антигенов тоже будут отмечены тонкими линиями преципитации, так что образуются сужающиеся кверху (меньше времени для поперечной диффузии) профили, получившие образное наименование «ракет Лорелла» (рис. 36). Высоту «ракеты» принято измерять от середины лунки до наиболее удаленной точки переднего фронта преципитации. Зависимость этой высоты от количества антигена, внесенного в лунку, нелинейна, но хорошо ложится на плавную калибровочную кривую (рис. 37). Ее строят для каждого опыта, отводя 4—5 лунок для известных разбавлений определенной начальной концентрации антигена (первые четыре лунки слева на рис. 36). Ближе к прямолинейной выглядит зависимость квадрата высоты «ракеты» от количества антигена [Mueller, Potter, 1979]. Для количественных определений, вообще говоря, не обязательно вести электрофорез до полного исчерпания антигена в

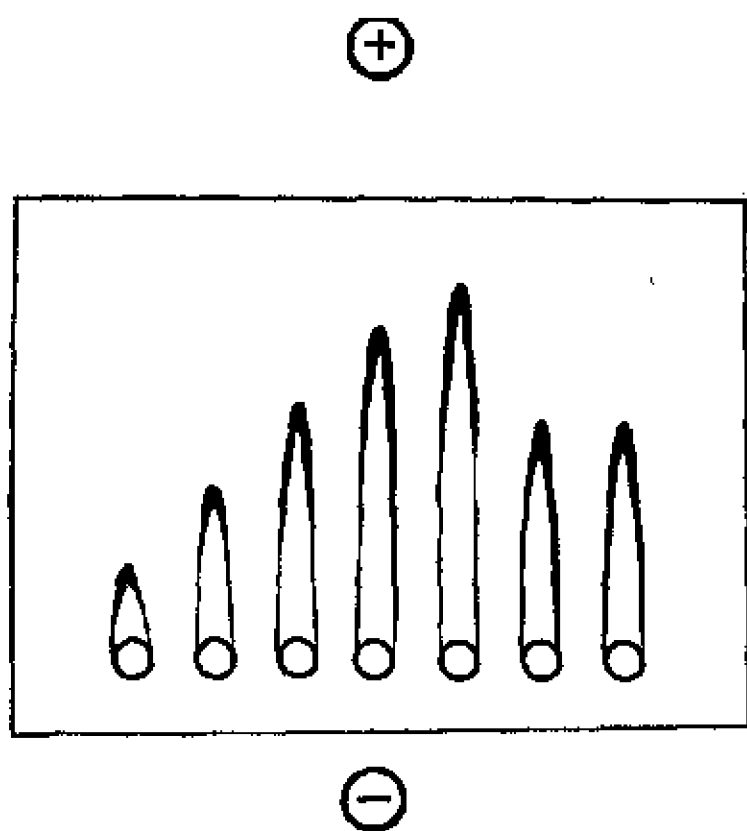


Рис. 36. «Ракеты Лорелла» (см. текст)

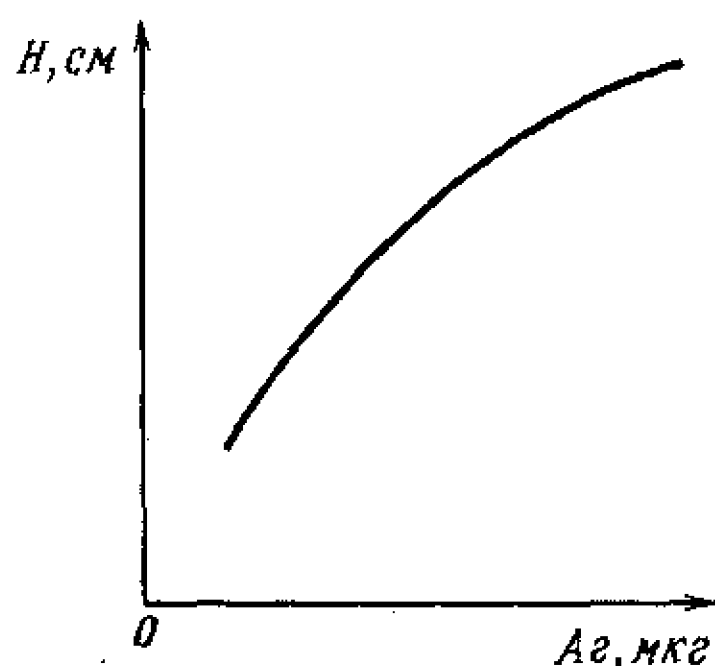


Рис. 37. Калибровочная кривая для определения количества антигена по методу Лорелла

Ag — количество антигена в лунке; H — высота соответствующей «ракеты»

лунках и прекращения роста ракет. Нужно только позаботиться о том, чтобы калибровочная кривая снималась в строго идентичных условиях и на ней было бы достаточное число точек.

Измерить высоты «ракет Лорелла» зачастую удастся без окрашивания, наблюдая их во влажном геле на черном фоне при боковом освещении. Если необходимо, то после отмывки неprecипитировавших белков агарозный гель можно высушить и окрасить, как было описано для иммуноэлектрофореза.

Концентрации исследуемых растворов антигена, как и исходное разбавление и объемную концентрацию антисыворотки в геле агарозы, приходится подбирать опытным путем, чтобы «ракеты» были достаточно хорошо видны, а их высоты (после исчерпания запасов антигена во всех лунках) лежали в интервале 1—5 см. Такие высоты можно достаточно точно измерить; вместе с тем, электрофорез не занимает слишком много времени. Очевидно, что чем больше отношение концентрации антигенов в лунках к концентрации антител в геле, тем выше будут «ракеты Лорелла». Абсолютные же значения этих концентраций диктуются необходимостью получения четких линий преципитации. В качестве ориентировочных цифр можно рекомендовать загрузку 5 мкг антигена на лунку при внесении в гель неразбавленной антисыворотки до концентрации 2,5% по объему. Если гель предполагается окрашивать, то обе исходные цифры можно уменьшить в 10 раз. Опыты можно ставить в двух вариантах: с полиспецифической антисывороткой для определения количества чистого антигена или с моноспецифической для определения количества данного антигена в смеси с другими.

В качестве примера использования электроиммунного анализа по Лореллу для определения количества антигена (геликазы II в экстракте *E. coli*) можно рекомендовать ознакомиться

с уже цитированной работой Клинкерта и соавторов [Klinkert et al., 1980].

Прауз и соавторы предложили микромодификацию метода Лорелла. Весь процесс переносят в капилляры диаметром около 1 мм. Агарозу с антисывороткой полимеризуют в капилляре, а раствор антигена наносят на торец столбика геля, как при обычном электрофорезе в трубках. Опыт ведут в стандартном приборе для вертикального электрофореза. Здесь, разумеется, не образуется никаких «ракет», поскольку поперечная диффузия антигена отсутствует, и это повышает чувствительность метода. Измеряют расстояние плоского фронта преципитации от начала геля после прекращения продвижения этого фронта вдоль трубки в связи с исчерпанием антигена. Столбики гелей из серии капилляров выдавливают водой на покрытую агарозой пластинку, выравнивают их там по сетке подложенного снизу трафарета и закрепляют несколькими каплями расплавленной агарозы. В таком виде все столбики геля одновременно окрашивают. Удастся обнаружить до 10^{-3} мкг белка-антигена при объемной концентрации неразбавленной антисыворотки в агарозе около 0,1 %.

Поскольку расстояние миграции фронта преципитации определяется только исходным количеством антигена, а объем его раствора роли не играет, то можно к каждому капилляру присоединить резервуар емкостью, например, в 5 мл и заполнить его разбавленным раствором антигена. Таким способом (разумеется, за счет увеличения продолжительности процесса) можно определить количество антигена в растворе с концентрацией 2×10^{-5} мкг/мл [Prause et al., 1978].

Собственно говоря, электрофорез в методе Лорелла нужен только для того, чтобы заставить молекулы антигена выходить из лунки и двигаться по пластинке с иммобилизованными в агарозе антителами. Того же результата можно добиться за счет действия капиллярных сил. Недавно Глэд и Крабб описали систему иммунокапиллярной миграции взамен «ракет Лорелла». Антитела ковалентно присоединяли на полоску CNBr-активированной целлюлозы. На дно пробирки наливали фиксированный объем (0,3 мл) раствора антигена и опускали туда один конец полоски. Жидкость поднималась вверх по полоске; при этом фронт антигена отставал за счет связывания его молекул с закрепленными на целлюлозе антителами. Положение этого фронта после окончания эксперимента легко установить, вымачивая полоску в растворе антител той же специфичности, но ферментативно или радиоактивно меченных. Поскольку концентрация раствора антигена в пробирке в ходе опыта не меняется, то нет необходимости дожидаться полного перехода всего этого раствора на целлюлозу. Можно фиксировать стандартный уровень, до которого должен каждый раз подниматься фронт жидкости, и проводить калибровку по концентрации антигена в растворе [Glad, Crubb, 1981].

ПЕРЕКРЕСТНЫЙ ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ**МЕТОД КЛАРКА И ФРИМЕНА**

Этот метод количественного двумерного, или, как его чаще называют, «перекрестного» иммуноэлектрофореза является комбинацией рассмотренных выше методов [Clarke, Freeman, 1967]. Сначала в первом направлении смесь белков-антигенов разделяют обычным электрофорезом в агарозе (или ПААГ). Затем следует электрофоретическая миграция разделившихся антигенов в перпендикулярном (втором) направлении. Миграция идет в геле агарозы, смешанной с полифункциональной антисывороткой против исходной смеси антигенов. Каждый белок-антиген во втором направлении мигрирует независимо от других и образует зоны преципитации, подобные «ракетам Лорелла», но более широкие у основания и напоминающие обычные хроматографические пики. Эта форма пиков обусловлена тем, что миграция начинается не из резко очерченной лунки, заполненной одинаковым по всему ее объему раствором антигена, а из более или менее размытой белковой зоны, образовавшейся в результате электрофореза в первом направлении.

Замечательно, что два антигена, оказавшиеся в одной зоне, т. е. не разделившиеся в ходе первоначального электрофореза, как правило, легко обнаруживаются в процессе электроиммунного анализа во втором направлении. Соответствующие пики преципитации, накладываясь друг на друга, как бы просвечивают один через другой, поэтому, если они не совпадают в точности по высоте и форме, их можно не только различить, но и обмерить (рис. 38). Различие двух пиков по высоте и форме может быть обусловлено различием содержания антигенов в общей белковой зоне, неодинаковостью концентраций специфических для них антител в антисыворотке и, наконец, разницей эквивалентных отношений концентраций антигенов и антител, обуславливающих положения зон преципитации. Если же положения белковых зон после электрофореза для двух антигенов не совпадают, то их пики оказываются соответственно сдвинутыми один относительно другого, что еще больше облегчает их идентификацию.

Изображенная на рис. 38 картина получена в результате перекрестного электрофореза сыворотки крови человека. Она достаточно сложна, содержит несколько десятков пиков, представляющих различные сывороточные белки, однако «расшифровать» ее не трудно. Этому способствуют и хорошо заметные на рисунке различия интенсивностей окрашенных пиков, обусловленные разницей в содержании антигенов в смеси и специфических к ним антител в антисыворотке. Механизм образования линий преципитации здесь точно такой же, как в методе Лорел-

ла, и электрофорез во втором направлении также ведется до исчерпания антигенов в первоначальных зонах разделения, т. е. до прекращения увеличения высоты всех пиков. Чем больше содержание данного антигена в смеси, тем выше его пик, но эта высота зависит и от содержания специфических для него антител в антисыворотке. Чем их больше, тем пик ниже, а обрисовывающая его линия преципитации интенсивнее.

Внимательно изучив топологию такой «горной страны» (см. рис. 38), можно не только обнаружить и идентифицировать множество антигенов, но и оценить соотношение их количеств в исследуемом препарате путем измерения площадей пиков. Способы идентификации отдельных пиков описаны ниже. Что же касается количественных оценок, то они, конечно, носят лишь ориентировочный характер, поскольку, как только что было отмечено, площадь и высота каждого пика зависят не только от содержания данного антигена в препарате, но и от концентрации специфических для него антител в антисыворотке. Однако метод

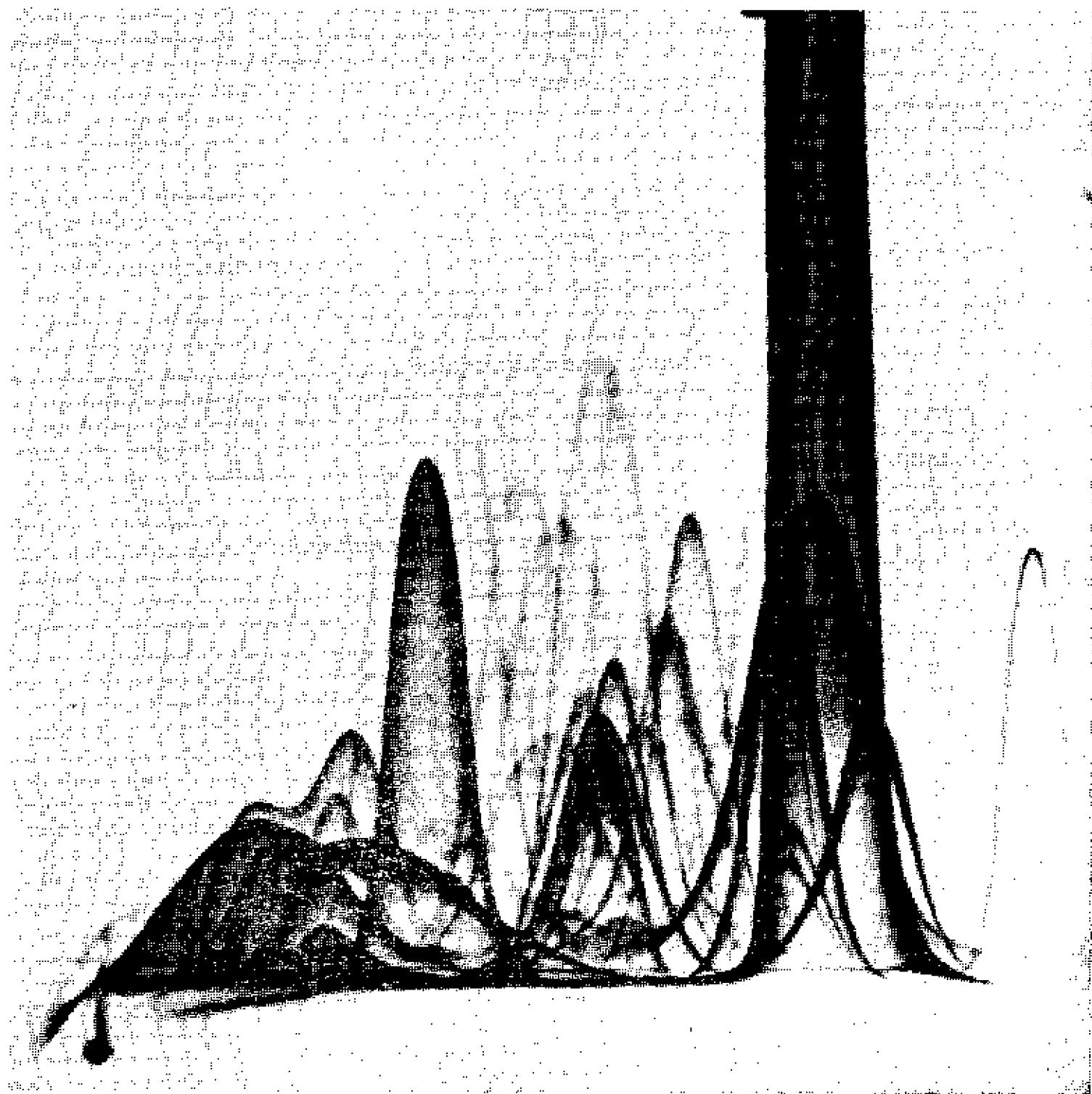


Рис. 38. Пики преципитации после перекрестного иммуноэлектрофореза белков: сыворотки крови человека

Препарат — 2 мкл неразбавленной сыворотки; электрофорез — 1,5 ч при напряженности: поля 10 В/см и 10°; иммуноэлектрофорез — в течение ночи при напряженности 2 В/см.

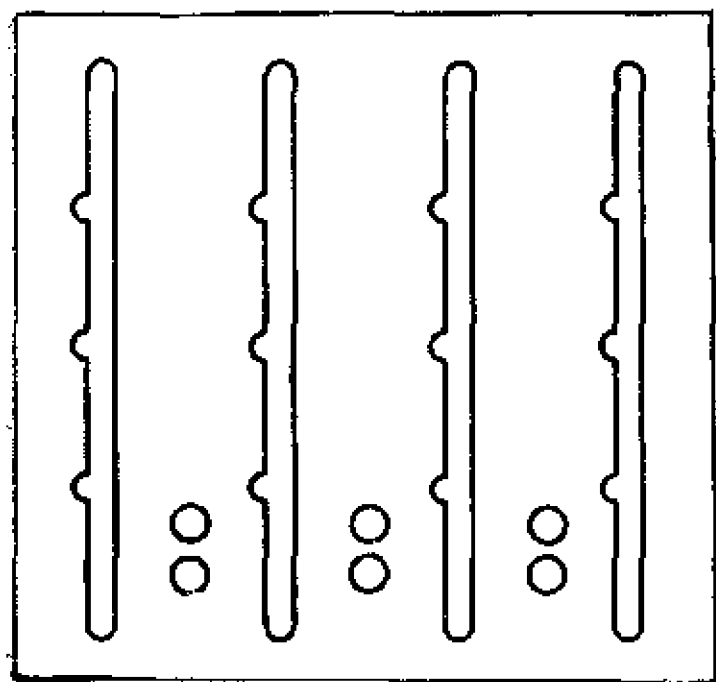


Рис. 39. Шаблон для вырезания геля первого направления в методе перекрестного иммуноэлектрофореза

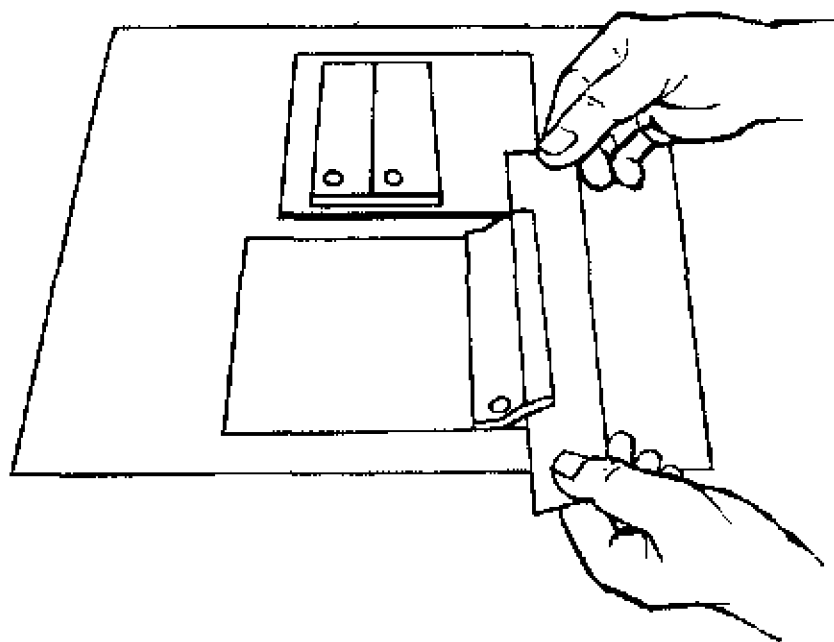


Рис. 40. Перенос полосы геля первого направления после электрофореза на пластину для заливки геля второго направления

безупречен при использовании его для обнаружения отклонения пропорций антигенов от некоторой нормы, например для выявления патологических изменений белкового состава крови или других физиологических жидкостей. В этом случае для сравнения используют одну и ту же иммунную полиспецифическую антисыворотку и картину распределения пиков для исследуемого препарата сопоставляют с распределением для нормального контрольного образца.

Технические приемы, используемые в рассматриваемом методе, связаны с необходимостью формирования составного геля. Электрофорез в первом направлении должен проходить в геле без антител. Переход ко второму направлению — это переход молекул антигенов под действием поля в гель агарозы, смешанной с антисывороткой. Здесь, в частности, возникает проблема надежного контакта между двумя гелями. При этом второй гель приходится формировать после окончания фракционирования антигенов в первом геле во избежание диффузии антител в него во время электрофореза.

Практически поступают следующим образом. С помощью специального шаблона с отверстиями и прорезями в пластине геля первого направления вырезают лунки для исходных препаратов и разрезают ее на полосы в направлении электрофореза. На рис. 39 изображен такой шаблон, предназначенный для одновременного электрофореза трех препаратов. Наличие двух отверстий для каждой полосы геля имеет отношение к описанному ниже методу идентификации антигенов. Здесь пока используется по одному отверстию в каждой полосе. Электрофорез проводят в тех же условиях, что были описаны для метода иммуноэлектрофореза по Грабар и Уильямс.

По окончании электрофореза с помощью тонкой, заточенной с одной стороны металлической пластинки отделяют каждую

полосу и переносят ее на край другой стеклянной пластины (рис. 40). Остальную часть этой пластины заливают расплавленной смесью 1%-ной агарозы с антисывороткой, так чтобы новый слой геля имел такую же толщину, как полоса первого направления, и сплавился в ней в один сплошной слой. Здесь надо иметь в виду те же соображения о необходимости надежного сцепления геля с подложкой, какие были высказаны при описании метода «ракет Лорелла». Двуслойную пластину снова устанавливают в прибор для горизонтального электрофореза, повернув ее на 90°. Катодный фитиль накладывают вдоль наружного края полосы геля первого направления. Теперь в ходе электрофореза разделившиеся антигены переходят в гель агарозы с антисывороткой и образуют в нем пики преципитатов, как было описано выше. Далее следует, как обычно, отмывка от непреципитировавших белков, сушка и окрашивание геля.

В качестве примера процитируем недавнюю работу, посвященную исследованию мембранных белков тромбоцитов человека [Shulman, Karpatkin, 1980]. В первом направлении электрофорез вели в 1%-ном геле агарозы, растворенной в буфере, содержащем 0,02 М веронала и 0,07 М Триса (pH 8,6). Для улучшения растворимости мембранных белков в буфер добавляли 1% Тритона X-100. Слой геля толщиной 1,3 мм формировали на стеклянной пластинке размером 5×5 см. В лунку диаметром 5 мм вносили 50 мкг белкового препарата, растворенного в 20 мкл того же буфера. Электрофорез при напряжении 150 В занимал около 2,5 ч. Затем вырезали полоску шириной 1,2 см, переносили ее на точно такую же стеклянную пластинку и заливали в качестве геля второго направления 1%-ный раствор агарозы, содержащий 6% (по объему) антисыворотки с концентрацией белка 2 мг/мл. Электрофорез во втором направлении вели в течение 18 ч при напряжении 55 В. Гель агарозы отжимали и одновременно промывали 6—8 раз 0,1 М раствором NaCl, сушили на воздухе и окрашивали 0,25%-ным раствором CBV R-250 в смеси, содержащей 9% CH_3COOH и 45% этанола.

Заметим в заключение, что в тех случаях, когда отдельные пики на сложной картине перекрестного иммуноэлектрофореза возвышаются настолько, что некоторую их часть можно вырезать скальпелем, не затронув другие пики, то открывается возможность для полипептидного анализа содержащихся в них чистых антигенов [Norrild et al., 1977].

ТАНДЕМНЫЙ ПЕРЕКРЕСТНЫЙ ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Идентификацию пика определенного антигена в сложной картине, полученной после перекрестного иммуноэлектрофореза смеси белков, можно осуществить с помощью следующего приема. В полосе геля для электрофореза первого направления вырезают не одну, а две лунки, расположенные друг за другом в направлении миграции белков (с этой целью в шаблоне, изображенном на рис. 39, и предусмотрено по два отверстия в каждой полосе). В одну из лунок вносят исследуемую смесь ан-

тигенов, в другую — чистый антиген, пик которого надо отыскать на иммуноэлектрофореграмме. Затем проводят все описанные выше операции перекрестного иммуноэлектрофореза.

Теперь на конечной картине можно отыскать два плавно переходящих один в другой пика, расстояние между которыми точно такое же, как между лунками. Пики могут быть различной высоты (содержание антигена в смеси белков неизвестно), но наличие плавного перехода между ними указывает на то, что оба они обязаны своим появлением одному и тому же белку. Между тем, в одной из лунок находился искомый антиген. Таким образом, пик этого антигена обнаруживается и среди множества пиков сложной смеси. Какой из сдвоенных пиков относится к смеси — ясно из того, в каком порядке вносили антиген и исследуемый препарат в лунки. Описанный прием иногда называют «тандемным» перекрестным иммуноэлектрофорезом (рис. 41).

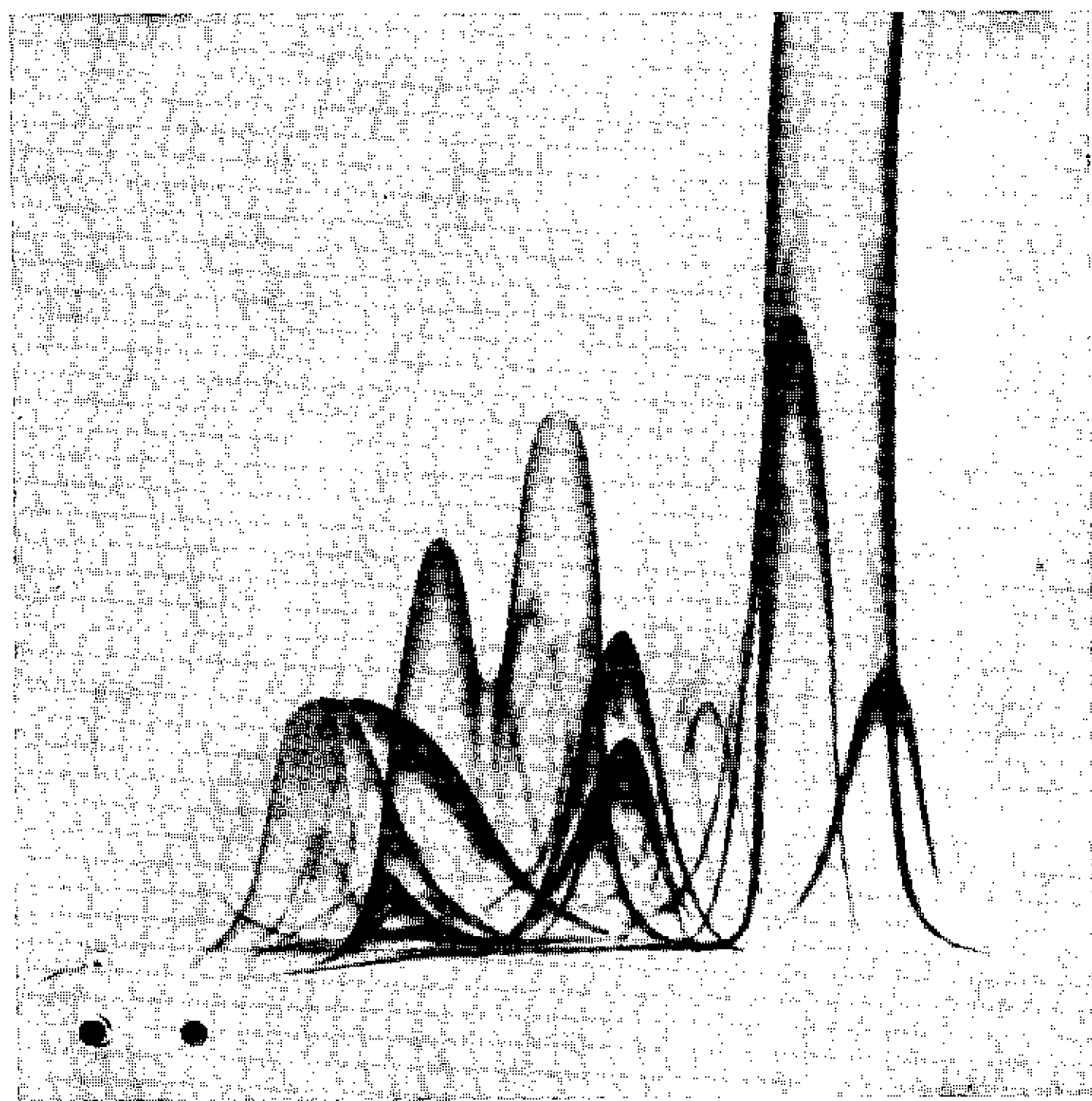


Рис. 41. Идентификация пика трансферрина среди белков сыворотки крови человека методом тандемного перекрестного иммуноэлектрофореза (см. текст)

1 — лунка препарата сыворотки; 2 — лунка трансферрина

РАЗЛИЧНЫЕ ВАРИАНТЫ РАЗДЕЛЕНИЯ В ПЕРВОМ НАПРАВЛЕНИИ

Среди таких вариантов в первую очередь можно назвать метод ИЭФ, подробно описанный в части I. Манипуляции с полоской геля агарозы после ИЭФ точно такие же, как в случае электрофореза, если не считать операции перевода геля в вероналовый буфер путем вымачивания его в двух-трех сменах этого буфера, по 15 мин в каждой. Характерные для ИЭФ узкие белковые зоны при этом немного расширяются за счет диффузии, но наглядность картины перекрестного иммуноэлектрофореза от этого не страдает. Амфолиты можно вымывать не полностью, так как они не мешают иммунопреципитации.

При электрофорезе в первом направлении для улучшения растворимости белков нередко вводят неионный детергент, например 1%-ный раствор Тритона X-100. Можно вести электрофорез в агарозе и в присутствии ДДС-Na (также только в интересах растворимости, ведь разделение белков по размерам в геле агарозы производить не целесообразно). ДДС-Na при перекрестном иммуноэлектрофорезе под действием поля может переходить в слой агарозы, смешанной с антисывороткой. Этого следует избегать, так как уже упоминалось, что ДДС-Na мешает образованию иммунного комплекса антиген — антитело. В этом случае гель первого направления предварительно вымачивают в буфере, содержащем избыток Тритона X-100, а иногда его вводят и в состав геля агарозы с антисывороткой. Тритон X-100 вытесняет ДДС-Na из комплекса с белком и образует с ним смешанные мицеллы, не препятствующие иммунопреципитации.

При рассмотрении методов электрофореза был описан вариант со смещением заряда [Остерман, 1981]. Суть его в том, что в буфер геля одновременно с Тритоном X-100 вводят дезоксихолат натрия или цетавлон. Два этих детергента имеют ионную природу и могут нести соответственно отрицательный и положительный заряды. Они связываются с Тритоном X-100, образуя смешанные мицеллы, а через него — и с гидрофобными белками, которые при этом приобретают дополнительный заряд, нередко способствующий их отделению от прочих белков. Такой подход при электрофорезе в первом направлении был использован Бхакди и соавторами при изучении белков, экстрагированных из мембран эритроцитов, методом перекрестного иммуноэлектрофореза. В присутствии дезоксихолата авторы наблюдали заметный сдвиг некоторых пиков по сравнению с контрольным опытом (без дезоксихолата), например для антитрипсина, орозомукоида и третьего белка комплемента [Bhakdi et al., 1977].

Бьеррум для отделения гидрофобных белков использовал другой оригинальный прием. В 1%-ный гель агарозы он вводил гидрофобные матрицы — фенилсефарозу CL-4B или октилсефарозу CL-4B (фирмы «Pharmacia»), просто смешивая их взвесь с

расплавленной агарозой. В ходе электрофореза в первом направлении гидрофобные белки отставали от гидрофильных за счет своего взаимодействия с матрицей. Выходу их в гель второго направления при перекрестном иммуноэлектрофорезе способствовал Тритон X-100, который вносили в этот гель до концентрации 1%. Степень гидрофобного взаимодействия белков с матрицей можно еще увеличить, вводя в гель первого направления 0,4 М раствор сульфата аммония. При такой постановке опыта скорость миграции будут изменять и слабогидрофобные, и даже в целом гидрофильные белки, на поверхности которых всегда имеются локальные гидрофобные участки.

МЕТОД НАЛОЖЕНИЯ ПОЛОСЫ ПААГ НА ГЕЛЬ АГАРОЗЫ

Разделение антигенов в первом направлении путем электрофореза в геле агарозы базируется, в основном, на различии электрических зарядов белков, входящих в состав смеси, так как торможение миграции за счет трения в крупнопористом геле агарозы существенной роли не играет. Между тем, в ряде случаев белки-антигены желательнее разделять по их размерам. Для этой цели электрофорез в первом направлении проводят в ПААГ.

Такой вариант был использован при иммунохимическом исследовании мембранных белков шпината и хламидомонады [Chua, Blomberg, 1979]. Эти белки растворяли с помощью ДДС-Na; электрофорез вели тоже в ПААГ с ДДС-Na. В ходе электрофореза во втором направлении до вступления в гель агарозы с антисывороткой антигены должны, как уже указывалось, освободиться от ДДС-Na. Для этой цели полоску ПААГ заплывляли в агарозу с добавлением 1% дезоксихолата натрия (ДОХ-Na), а затем на пути антигенов помещали еще и полоску промежуточного геля агарозы, содержащую 1,5% неионного детергента Lubrol PX. По-видимому, этот детергент, подобно Тритону X-100, вытесняет ДДС-Na из комплекса с белком и связывает его в смешанные мицеллы. За полоской с Lubrol PX следовал гель агарозы, содержащий антитела.

Назначение ДОХ-Na — способствовать выходу белков из ПААГ в агарозу. При pH 8,6 ДОХ-Na заряжен отрицательно и мигрирует через полоску ПААГ в направлении анода. Образованию иммунного комплекса он не мешает. В гель агарозы с антителами был введен еще и полиэтиленгликоль в концентрации 4%. Замечено, что он способствует иммунопреципитации и в несколько раз увеличивает чувствительность метода.

Недавно было показано, что ДДС-Na в достаточной степени отмывается из полоски ПААГ смесью изопропанол— CH_3COOH —вода (25 : 7 : 68) в течение ночи. Разделившиеся белки при этом фиксируются, так что полоску можно хранить до начала электрофореза во втором направлении длительное время. Более того, белки одновременно окрашивали, добавляя в указанную смесь

СВВ R-250 до концентрации 0,2%, а затем отмывали тем же раствором. Оказалось, что все это не мешает проведению электрофореза в перпендикулярном направлении (в 1%-ной агарозе с антисывороткой) — под действием электрического поля осажденные белки вновь растворялись, мигрировали в агарозу и успешно образовывали пики преципитатов [Kessler, 1981].

На стыке гелей ПААГ и агарозы в силу заметного различия степени эндосмоса может иметь место смазывание линий иммунопреципитации и искажение ее картины, поэтому используют специальный метод наложения полосы ПААГ на гель агарозы. Последний формируют из двух частей. У края пластины, который впоследствии будет обращен к катоду, заливают слой геля агарозы без антисыворотки с таким расчетом, чтобы он был на несколько миллиметров шире, чем полоса ПААГ, которую предстоит уложить на этот слой вровень с наружным его краем. Вплотную к «пустому» слою агарозы на остальной площади пластины слоем такой же толщины формируют гель агарозы в смеси с антисывороткой. Линия раздела двух слоев должна быть параллельна катодному краю пластины и ориентированной по нему полосе ПААГ. Переносить и накладывать эту последнюю на гель агарозы удобно с помощью упомянутой выше тонкой металлической пластинки. Перед наложением пластинку следует повернуть полосой геля к себе, а затем перевернуть гелем вниз и таким образом уложить его на поверхность агарозы. Электродные фитили накладывают на наружный край полосы ПААГ (катодный) и на противоположный край пластины геля агарозы. В ходе электрофореза во втором направлении антигены из ПААГ переходят в гель агарозы и далее мигрируют в ней, образуя пики преципитации. Различие степени эндосмоса в этом случае никаких проблем не создает.

ВВЕДЕНИЕ ПРОМЕЖУТОЧНОГО ГЕЛЯ

Выше был описан «тандемный» способ идентификации одного из антигенов в их смеси при перекрестном иммуноэлектрофорезе. Для него требуется наличие чистого антигена. В том случае, когда вместо этого в распоряжении исследователя имеется моноспецифическая антисыворотка для этого антигена, с той же целью можно воспользоваться другим приемом — введением промежуточного геля. Вслед за окончанием электрофореза в первом направлении готовят пластину для второго направления, как было описано в случае обычного перекрестного иммуноэлектрофореза. Затем из слоя геля агарозы с полиспецифической антисывороткой вырезают и удаляют полосу шириной 1—2 см, прилегающую к гелю первого направления. На ее место заливают новую порцию раствора агарозы той же концентрации, но смешанного с моноспецифической антисывороткой.

В ходе электрофореза во втором направлении искомый антиген начнет образовывать пик преципитации сразу по выходе из

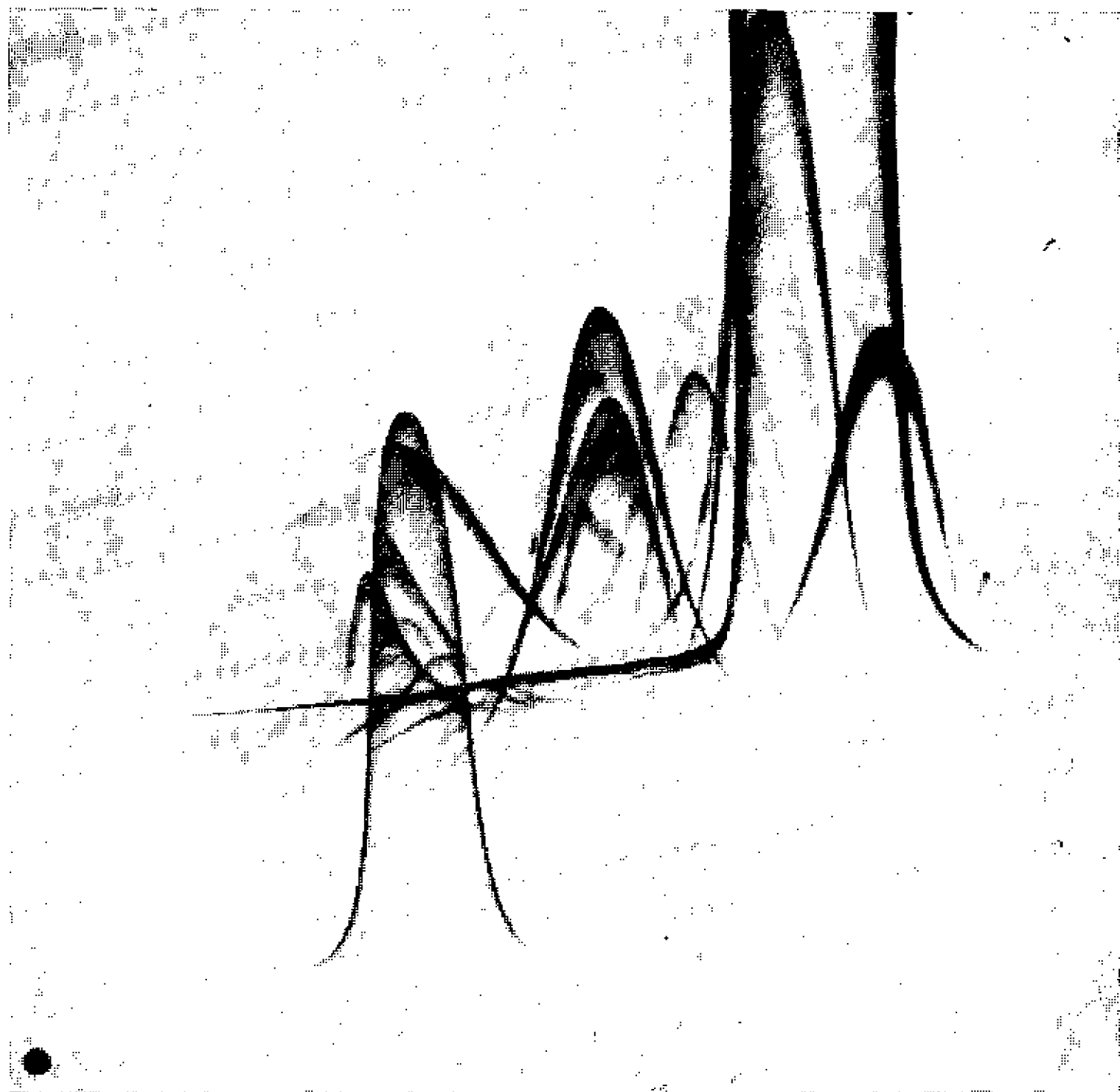


Рис. 42. Идентификация пика трансферрина в том же препарате, что и на рис. 41, методом промежуточного геля (см. текст)

геля первого направления, поскольку в промежуточном слое он встретится со специфичной для него антисывороткой. В то же время молекулы всех остальных антигенов будут без задержки проходить через промежуточный слой и основания их пиков преципитации будут лежать на границе промежуточного слоя и остального геля агарозы, содержащего полиспецифическую антисыворотку (рис. 42). Таким образом, искомый антиген явным образом выделится из множества белков-антигенов.

МЕТОД «СЛИВШИХСЯ РАКЕТ»

В отличие от исходного метода «ракет Лорелла», данный метод используется не для количественных определений, а для обнаружения гетерогенности фракций, кажущихся гомогенными при разделении каким-нибудь из неэлектрофоретических методов, например гель-фильтрацией или ионообменной хроматографией.

С помощью шаблона в неширокой полоске свободного от антител геля агарозы вырезают в шахматном порядке большое

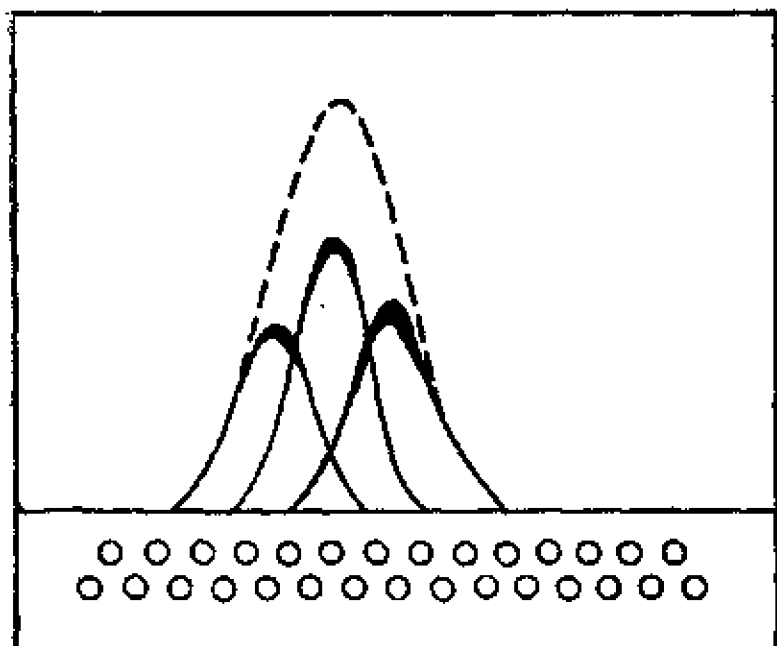


Рис. 43. Анализ гомогенности хроматографического белкового пика методом «слившихся ракет» (схема)

Пунктир — профиль хроматографического пика (A_{280}); сплошные линии — составляющие его белковые фракции, выявляемые иммуноэлектрофорезом

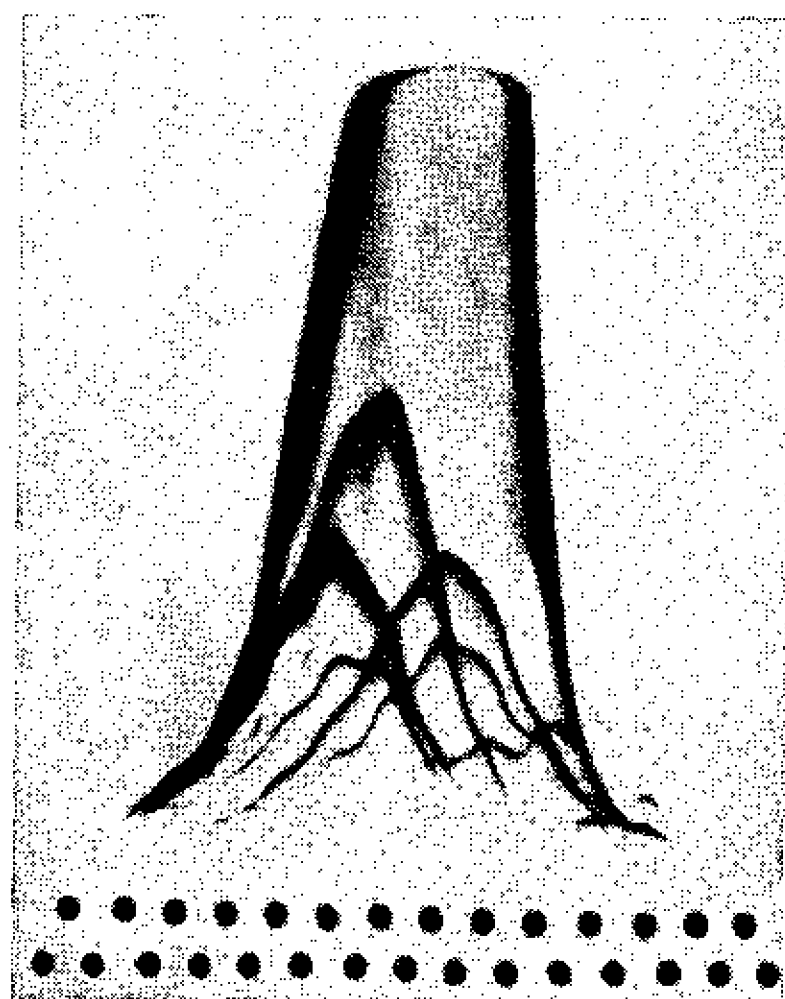


Рис. 44. Гетерогенность хроматографического пика, обнаруженная методом «слившихся ракет»

число близко расположенных отверстий (рис. 43). В них вносят из пробирок коллектора аликвоты всей последовательности элюированных с колонки фракций и оставляют их там на 30—45 мин, с тем чтобы в результате диффузии находящиеся во фракциях белки слились в сплошную картину распределения, соответствующую непрерывному току элюции материала с колонки (отсюда название — «метод слившихся ракет»). Затем оставшуюся часть пластинки заливают агарозой в смеси с полиспецифической антисывороткой и проводят электрофорез так же, как при выявлении «ракет Лорелла» или во втором направлении при перекрестном иммуноэлектрофорезе. Как и в последнем случае, благодаря различию в концентрациях и электрофоретических подвижностях антигенов, вышедших из хроматографической колонки в составе одного пика, а также различию в концентрациях специфических к ним антител в антисыворотке эти антигены удастся различить и тем самым установить негетерогенность хроматографического пика, если она имеет место, или, наоборот, подтвердить его гомогенность. Результат такого анализа иллюстрирует рис. 44. Из него видно, что в состав исследованного хроматографического пика, кроме основного белка, входит заметное количество белковых примесей.

- Гурвич А. Е., Кузовлева О. Б., Туманова А. Е.—Биохимия, 1961, 26, с. 934—941.
- Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981.
- Рохлин О. В., Венгерова Т. И., Незлин Р. С.—Молек. биология, 1970, 4, с. 906—917.
- Alwine J. C., Kemp D. J., Stark G. R.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1977, 74, p. 5350—5354.
- Bhakdi S.—J. Biochem. and Biophys. Meth., 1980, 2, p. 79—90.
- Bhakdi S., Bhakdi-Lehnen B., Bjerrum O. J.—Biochim. et biophys. acta, 1977, 470, p. 35—44.
- Bjerrum O. J.—Anal. Biochem., 1978, 90, p. 331—348.
- Borrebaeck C. A. K., Etzler M. E.—J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 4723—4725.
- Chua N.-H., Blomberg F.—Ibid., 1979, 254, p. 215—223.
- Clarke H. G. M., Freeman T.—Prot. Biol. Fluids, 1966, 14, p. 503—509.
- Daussant J., Mac Gregor A. W.—Anal. Biochem., 1979, 93, p. 261—266.
- Dion A. S., Farwell D. C., Pomenti A. A., Girard A. J.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1980, 77, p. 1301—1305.
- Eisenbarth G. S.—Anal. Biochem., 1981, 111, p. 1—16.
- Erlich H. A., Levinson J. R., Cohen S. N., McDevitt H. O.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 12240—12247.
- Glad C., Crubb A. O.—Anal. Biochem., 1981, 116, p. 335—340.
- Grabar P., Williams C. A.—Biochim. et biophys. acta, 1953, 10, p. 193—194.
- Guilfoyle T. J.—Biochemistry, 1980, 19, p. 5966—5972.
- Gustafson G. L., Milner L. A.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, 94, p. 1439—1444.
- Huchzermeier R., Tanenbaum S. W., Flashner M.—Anal. Biochem., 1980, 105, p. 454—460.
- Hughes E. N., August J. T.—J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 664—671.
- Immunochemistry: An advanced textbook/Ed. L. E. Glynn, M. W. Steward. Chichester: J. Wiley a. Sons, 1977.
- Katzmann J. A., Nesheim M. E., Hibbard L. S., Mann K. G.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1981, 78, p. 162—166.
- Kessler R. E.—Anal. Biochem., 1981, 116, p. 129—132.
- Klinkert M.-Q., Klein A., Abdel-Monem M.—J. Biol. Chem., 1980, 255, p. 9746—9752.
- Köhler G., Milstein C.—Nature, 1975, 256, p. 495—497.
- Krajewska M., Briggs R. C., Chiu J.-F., Hnilica L. S.—Biochemistry, 1980, 19, p. 4667—4673.
- Laurell C. B.—Anal. Biochem., 1966, 15, p. 45—52.
- Legocki R. P., Verma D. P. S.—Ibid., 1981, 111, p. 385—392.
- Lee J. S., Lewis J. R., Morgan T. R., Singh B.—Nucl. Acids Res., 1981, 9, p. 1707—1721.
- Maidment B. W., Papsidero L. D., Gamarra M. et al.—Anal. Biochem., 1981, 111, p. 336—342.
- Mueller U. W., Potter J. M.—Ibid., 1979, 100, p. 51—53.
- Norrild B., Bjerrum O. J., Vestergaard B. F.—Ibid., 1977, 81, p. 432—441.
- Nossal C. J. V. Antibodies and immunity. N. Y.: Basic Books Inc., 1978.
- Olden K., Yamada K. M.—Ibid., 1977, 78, p. 483—490.
- Olmsted J. B.—J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 11955—11957.
- Ouchterlony O.—Ark. kemi, 1950, 1, p. 43—50.
- Prause J. U., Sjöström H., Norén O., Josefsson L.—Anal. Biochem., 1978, 85, p. 564—571.
- Renart J., Reiser J., Stark G. R.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1979, 76, p. 3116—3120.
- Shen V., King T. C., Kumar V., Dagherty B.—Nucl. Acids Res., 1980, 8, p. 4639—4650.
- Showe M. K., Isobe E., Onorato L.—J. Mol. Biol., 1976, 107, p. 55—69.
- Symington J., Green M., Brackmann K.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1981, 78, p. 177—181.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1979, 76, p. 4350—4354.
- Walter G., Scheidtmann K.-H., Carbone A. et al.—Ibid., 1980, 77, p. 5197—5200.
- Wasserman E., Levine L.—J. Immunol., 1961, 87, p. 290—296.
- Weiss P. M., Del Vecchio V. G., Burnett J. B.—Anal. Biochem., 1978, 84, p. 512—521.

ЧАСТЬ ТРЕТЬЯ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАДИОАКТИВНЫХ ИЗОТОПОВ

ВВЕДЕНИЕ

Многие современные методы исследования белков и нуклеиновых кислот базируются на использовании радиоактивных изотопов. Замена одного или даже многих атомов молекулы биополимера их радиоактивными изотопами в подавляющем большинстве случаев практически не изменяет физико-химических характеристик и физиологической активности этих молекул. Вместе с тем, колоссальная чувствительность методов обнаружения радиоактивности позволяет уменьшить количества используемых в эксперименте препаратов до тысячных долей микрограмма. В исследованиях индивидуальных, содержащихся в организме в очень малых количествах белков и нуклеиновых кислот это обстоятельство играет решающую роль. Однако из самого существа метода вытекают два серьезных затруднения в его использовании, могущие служить источниками ошибок при трактовке результатов эксперимента.

Первое затруднение связано с «обезличенностью» радиоактивного излучения. Например, если в результате некоего эксперимента мы регистрируем излучение радиоактивного изотопа углерода, то само это излучение никоим образом не информирует нас о том, находятся ли атомы радиоактивного углерода в молекулах интересующего нас белка или в каких-то посторонних для данного эксперимента примесях. Природа этих примесей зависит не только от способа очистки препарата, но и от метода введения радиоактивности в интересующие нас биополимеры. Если оно осуществляется «естественным» путем биосинтеза в организме животного, которому с диетой или в виде инъекции ввели низкомолекулярные радиоактивные «предшественники», то не во власти экспериментатора проконтролировать все процессы метаболизма, в которых эти предшественники могут быть использованы. Если же радиоактивная «метка» вводится в уже очищенный биологический препарат *in vitro* химическим или ферментатическим путем, то, помимо возможности побочных реакций, всегда существует проблема полного отделения продукта от использованных в реакции исходных радиоактивных соединений. В связи с этим методам введения радиоактивных изотопов в молекулы биополимеров и способам очистки продуктов такого введения от радиоактивных «загрязнений» будет уделено значительное внимание.

Вторая, очень существенная, но зачастую недооцениваемая трудность использования радиоактивных изотопов вытекает из того обстоятельства, что, прежде чем трансформироваться в полезную количественную информацию в виде числа импульсов в минуту, регистрация радиоактивного излучения должна пройти через два сложных этапа преобразований. Первый этап связан со способом приготовления образца для счета радиоактивности. В подавляющем большинстве современных методов исследования каждый акт радиоактивного распада трансформируется во вспышку света в специальной среде, именуемой сцинтиллятором. Высокочувствительные приборы — счетчики сцинтилляций — регистрируют именно вспышки света. Такой прием позволил резко увеличить чувствительность регистрации радиоактивности по сравнению с ранее использовавшимися счетчиками излучения, работавшими по принципу ионизации и электрического разряда в газе (счетчики Гейгера, газопоточные счетчики). Последующее изложение почти целиком посвящено использованию сцинтилляционных счетчиков излучения, хотя те области, где сохранили свое значение ионизационные счетчики, тоже будут отмечены. Эффективность преобразования радиоактивного распада в явление сцинтилляции сильно зависит от способа приготовления препарата для счета и от выбора сцинтиллятора. Этим вопросам посвящена отдельная глава.

Второй важный этап — это регулировка, или, как говорят, «настройка» самого счетчика излучения. Современные сцинтилляционные счетчики предоставляют экспериментатору широкие возможности выбора оптимального режима работы прибора в соответствии с используемым изотопом, способом приготовления препарата, необходимостью коррекции неустраняемых факторов, влияющих на адекватность счета (хемолюминесценции, «тушения сцинтилляций»), возможностью независимого просчета радиоактивностей двух различных изотопов, входящих в состав препарата, и т. д. Выбор режима осуществляется путем вариации ряда параметров работы сложных электронных устройств, которыми оснащены современные счетчики излучения. Серьезное знакомство с функционированием этих устройств требует, к сожалению, весьма специальной радиотехнической подготовки. Вместе с тем, экспериментатор-биохимик, как правило, не может целиком доверить выбор режима инженеру, обеспечивающему эксплуатацию счетчика, так как здесь многое зависит от понятных только экспериментатору особенностей препарата.

Выход из положения состоит в том, чтобы, не вдаваясь в детали электроники, составить себе достаточное представление о принципе работы отдельных блоков регулирования, возможность управления которыми предоставлена в виде выведенных на панель прибора кнопок и рукояток, и о том, к каким результатам приведет манипулирование ими. Разумеется, конструкции приборов, поставляемых различными фирмами, отличаются друг от друга, но есть возможность рассмотреть общие для всех прин-

ципы регулирования, имея в виду, что конкретные практические указания читатель сможет почерпнуть из фирменных инструкций. Этому посвящена специальная глава. Для ее понимания, а также для углубленного усвоения всего остального материала целесообразно начать изложение с рассмотрения свойств используемых для биологических исследований радиоактивных изотопов и сцинтилляторов. Наконец, в заключительной главе описаны радиоиммунные методы исследования. Необходимые для понимания этих методов основы иммунохимии изложены в предыдущей части книги.

Глава 1

ИЗОТОПЫ, СЦИНТИЛЛЯТОРЫ И СЦИНТИЛЛЯЦИОННЫЕ СЧЕТЧИКИ РАДИОАКТИВНОСТИ

РАДИОАКТИВНЫЕ ИЗОТОПЫ

Химические свойства атома, как известно, определяются числом электронов, находящихся на его орбитах вне ядра. В ядре электрически нейтрального атома, в отличие от иона, содержится точно такое же число тяжелых положительно заряженных элементарных частиц — протонов. Это число определяет порядковый номер элемента в таблице Менделеева. Атомная масса практически равна массе ядер, куда, помимо протонов, входят лишенные заряда элементарные частицы такой же массы — нейтроны. Массой электронов ввиду ее малости пренебрегают. Атомную массу элемента часто представляют отвлеченным числом, указывающим сумму протонов и нейтронов. По существу говоря, при этом ее выражают через массу атома водорода, у которого в ядре содержится всего один протон.

Впрочем, существуют атомы, ведущие себя в химических реакциях точно так же, как водород, но вдвое и даже втрое более тяжелые — дейтерий и тритий. В ядрах этих атомов, помимо протона, содержатся соответственно один или два нейтрона. Эти атомы называют изотопами водорода, отмечая этим то обстоятельство, что «нормальным», широко распространенным в природе элементом является именно водород. Дейтерий так же устойчив, как водород; он входит в состав так называемой «тяжелой воды», и, если бы не его малая распространенность, мог бы претендовать на то, чтобы именоваться нормальным атомом.

В отличие от него, тритий — нестабильный изотоп. Рано или поздно каждый атом трития «обречен» на катастрофическую перестройку своего ядра, которая будет сопровождаться испусканием из атома некоей частицы (в данном случае электрона), обладающей значительной энергией. Такие изотопы именуются

радиоактивными, а само явление спонтанной перестройки ядра атома, сопровождающееся излучением энергии, называется радиоактивностью.

Число изотопов во много раз превышает число нормальных атомов. Для 103 элементов периодической системы известно свыше 1500 изотопов, из которых $\frac{4}{5}$ получено искусственным путем в атомных реакторах. Подавляющее большинство из них радиоактивно, а те, что получены искусственно, очень недолговечны — их «время жизни» измеряется иной раз малыми долями секунды. Претерпев одну или несколько последовательных трансформаций, радиоактивные изотопы превращаются в стабильные изотопы, но уже другого элемента, как это будет видно из последующего рассмотрения механизмов превращения некоторых радиоактивных изотопов, представляющих интерес для биохимических исследований.

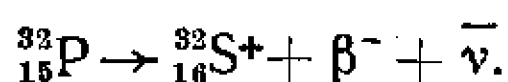
О химических свойствах элемента или его изотопа говорит общепринятый химический символ. Так, для обозначения всех изотопов водорода служит символ H, для всех изотопов иода — I и т. д. Атомную массу обозначают цифрой, стоящей слева вверху, а число протонов в ядре — цифрой, стоящей слева внизу по отношению к символу элемента. Таким образом, обозначение нормального атома фосфора $^{31}_{15}\text{P}$ указывает на то, что в ядре этого атома содержится 15 протонов (что соответствует его порядковому номеру в таблице Менделеева) и 16 нейтронов. Водород, дейтерий и тритий обозначают соответственно ^1_1H , ^2_1H и ^3_1H .

Нижний значок, по существу, является лишним — число протонов в ядре однозначно связано с химическими свойствами атома, отраженными в его символе. Однако этот значок удобно сохранить при написании реакций преобразования элементов. Он поможет проследить за изменениями числа протонов в ядре в результате радиоактивного распада. В остальном изложении для обозначения радиоактивных изотопов будут сохранены только верхние значки (^3H , ^{32}P , ^{14}C и т. д.). Кстати, из такого обозначения видно, например, что в ядре радиоактивного фосфора содержится один дополнительный, «лишний» нейтрон, а в ядре радиоактивного углерода — даже два (нормальный углерод — $^{12}_6\text{C}$). В этом-то все и дело. Оказывается, что лишь определенное соотношение числа нейтронов и протонов обеспечивает стабильное существование атомного ядра. Избыток или недостаток нейтронов приводит к нестабильному состоянию ядра и в конце концов — к спонтанной его перестройке, т. е. к радиоактивному распаду. Рассмотрим теперь характер таких перестроек.

Избыток нейтронов

Этот избыток может быть ликвидирован за счет ядерной реакции преобразования нейтрона в пару протон+электрон: Нейтрон→Протон+Электрон↗. Значок ↗ указывает на то, что

электрон не остается в ядре, а испускается атомом в виде свободного электрона, движущегося со значительной энергией. Испускание этого электрона, или, как его называют в этом случае, « β -частицы», служит внешним проявлением радиоактивного преобразования ядра изотопа — « β -распада». В ядре появляется дополнительный протон; следовательно, исходный атом превращается в атом следующего по порядку элемента периодической системы. Например, β -распад радиоактивного изотопа фосфора приводит к превращению его в стабильный ион серы:



В ядре серы соотношение частиц устойчиво: 16 протонов и 16 нейтронов. Нехватка одного электрона в электронной оболочке серы (от фосфора осталось 15 электронов вместо нормальных для серы 16) указывает на то, что получается ион серы. Значок β^{-} означает испускаемую из ядра β -частицу (электрон). В уравнении фигурирует еще и $\bar{\nu}$ (нейтрино) — незаряженная элементарная частица ничтожной массы, испускаемая из ядра одновременно с электроном. Она не участвует в перераспределении зарядов и соотношении масс тяжелых частиц (нуклонов) атомного ядра, но играет важную роль в установлении нового баланса энергии. Дело в том, что после описанного превращения ядра («трансмутации») новое ядро обладает избытком энергии, от которого оно должно избавиться, чтобы придти в истинно стабильное состояние. Часть этой энергии уносит вылетающая с большой скоростью β -частица. Другая ее часть удаляется в виде энергии движения нейтрино. Избыточная энергия ядра после трансмутации — величина, строго определенная для данной реакции β -распада, но распределение этой энергии между β -частицей и нейтрино происходит случайным образом, поэтому интересующая нас энергия β -частицы в каждом единичном акте β -распада может иметь любое значение — от максимальной ($E_{\max}$) до нулевой.

Величина $E_{\max}$, очевидно, характерна для данной ядерной реакции и определяется природой изотопа, участвующего в β -распаде. Энергию движения элементарных частиц принято выражать в килоэлектронвольтах (КэВ). 1 КэВ — это энергия, которую приобретает электрон, если его в пустоте ускоряет электрическое поле с разностью потенциалов в 1000 В; $1 \text{ КэВ} = 1,6 \times 10^{-16} \text{ Дж}$. Нам интересны не столько абсолютные значения $E_{\max}$ для различных изотопов, сколько их соотношение. С этой целью сопоставим значения $E_{\max}$ в килоэлектрон-вольтах для четырех наиболее интересных с точки зрения биохимика изотопов, испытывающих β -распад: ${}^3\text{H}$ —18,6; ${}^{14}\text{C}$ —145; ${}^{35}\text{S}$ —167; ${}^{32}\text{P}$ —1708. Как видно из этих цифр, максимальная энергия, с которой электроны могут вылетать из ядра радиоактивного атома фосфора, почти в 100 раз превышает максимальную энергию, которую может приобрести электрон при β -распаде трития.

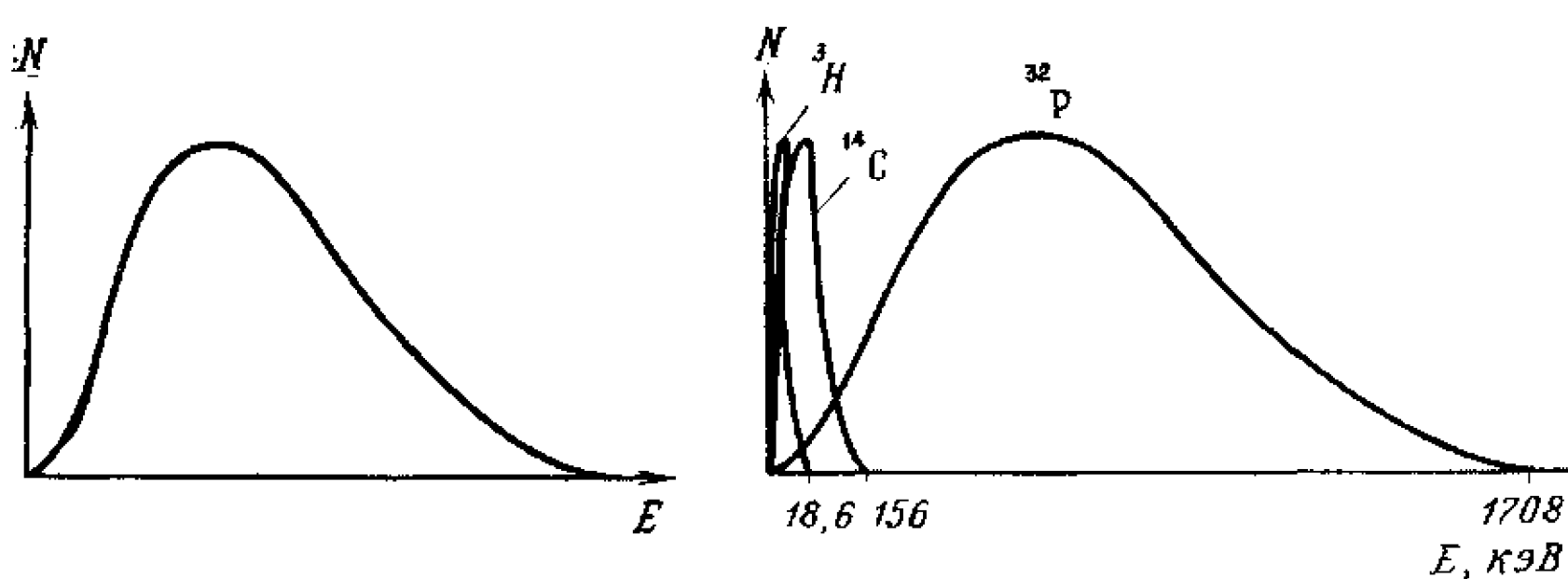


Рис. 45. Спектр распределения β -частиц по их энергиям

E — энергия частицы; N — число импульсов в минуту

Рис. 46. Энергетические спектры β -частиц для ^3H , ^{14}C и ^{32}P

Для огромной совокупности практически одновременно распадающихся атомов данного изотопа статистически устанавливается строго определенное соотношение чисел электронов, получающих в момент β -распада то или иное значение энергии. С помощью описанных ниже устройств можно регистрировать число β -частиц, вылетающих из радиоактивного препарата за определенный отрезок времени, причем только тех, энергии которых лежат в заданном диапазоне ΔE . Продвигаясь с таким диапазоном (неизменной ширины) от нулевого уровня энергии до E_{max} и подсчитывая каждый раз число электронов, вылетающих из препарата за 1 мин, можно построить так называемый «энергетический спектр» излучения электронов для выбранного препарата. Общий характер такого спектра представлен на рис. 45. По оси ординат отложено число «импульсов» в минуту, ибо в счетчиках радиоактивности, как мы увидим ниже, каждый акт испускания β -частицы регистрируется одним электрическим импульсом. Представив себе, что задаваемые диапазоны энергии становятся все уже, можно перейти к плавной огибающей спектра. Легко понять, что форма этой огибающей не зависит от количества радиоактивного изотопа в препарате, а обусловлена лишь его природой. Изменение количества отразится только на масштабе ординаты графика.

Энергетический спектр далеко не равномерен. Вероятность испускания электронов с очень малой энергией, как и с энергией, близкой к E_{max} , очень мала. Опыт и теория показывают, что с наибольшей вероятностью можно ожидать появления β -частиц с энергией, равной $1/3 E_{\text{max}}$. Этой энергии соответствует максимум на кривой (см. рис. 45).

Из-за отмеченных выше различий E_{max} энергетические спектры разных изотопов сильно отличаются друг от друга, но не своим характером (он одинаков), а степенью растянутости вдоль оси абсцисс. Для сопоставления на рис. 46 в одинаковом масштабе представлены спектры ^3H , ^{14}C и ^{32}P .

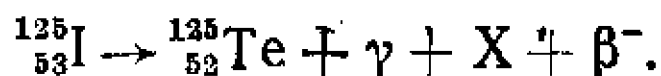
Недостаток нейтронов

Неустойчивость ядер радиоактивных изотопов может быть обусловлена не только избытком, но и недостатком нейтронов. Компенсировать этот недостаток может ядерная реакция преобразования одного из протонов в нейтрон, обратная рассмотренной выше: Протон + Электрон → Нейтрон. Однако внутри ядра нет свободного электрона, поэтому он должен быть захвачен с ближайшей к ядру К-орбиты, на которой у всех атомов (кроме водорода) находятся два электрона. Такой захват и описанная реакция действительно реализуются, что приводит к целому ряду интересных последствий. Прежде всего, уменьшение числа протонов в ядре означает образование элемента, предшествующего исходному в таблице Менделеева. Происходит, так сказать, «трансмутация влево». Например, при превращении одного из радиоактивных изотопов иода ($^{125}_{53}\text{I}$) образуется стоящий слева от него теллур: $^{125}_{53}\text{I} \rightarrow ^{125}_{52}\text{Te}$ (в изотопе иода — нехватка двух нейтронов; «нормальный» иод — $^{127}_{53}\text{I}$). Такое превращение происходит спонтанно, без подвода энергии извне, поэтому, как и в предыдущем случае, оно должно быть связано с переходом от состояния с большей энергией к состоянию с меньшей энергией. Иными словами, и в этом варианте ядерной реакции должна испускаться избыточная энергия. В первую очередь — это «лишняя» энергия ядра. Ее удаление на этот раз не связано с испусканием каких-либо частиц, а происходит путем электромагнитного излучения, которое принято называть «γ-излучением». От жесткого рентгеновского излучения («Х-излучения») оно отличается только своим происхождением из ядра. Энергия γ-излучения при трансмутации влево у разных изотопов варьирует в широких пределах — от 10 до 7000 КэВ. Для ^{125}I она строго определена (35 КэВ). Это — «мягкое» γ-излучение. Отметим, что его энергия примерно соответствует наиболее вероятному значению в энергетическом спектре β-излучения углерода (см. рис. 46).

Последствия «К-захвата» электрона не исчерпываются γ-излучением из ядра. Ближайшая к ядру К-орбита электронов не может оставаться незаполненной. На нее падает электрон с одной из более удаленных от ядра орбит, на освободившееся место может перейти электрон с еще более удаленной орбиты и т. д. Каждый такой электронный переход приводит к испусканию рентгеновского излучения (Х), тем более «жесткого», чем больше разница энергий электронов на двух орбитах, между которыми происходит переход. Но и это не все. Часть энергии рентгеновского или γ-излучения может быть передана одному из слабо связанных с ядром электронов наружной орбиты атома. Такой электрон, оторвавшись от атома, будет испущен в окружающую среду; возникнет «мягкое» β-излучение. По имени своего исследователя оно получило название «эффекта Оже» (Auger), а участвующие в нем β-частицы, в отличие от ядерных, нередко называют электронами Оже. Их энергия невелика —

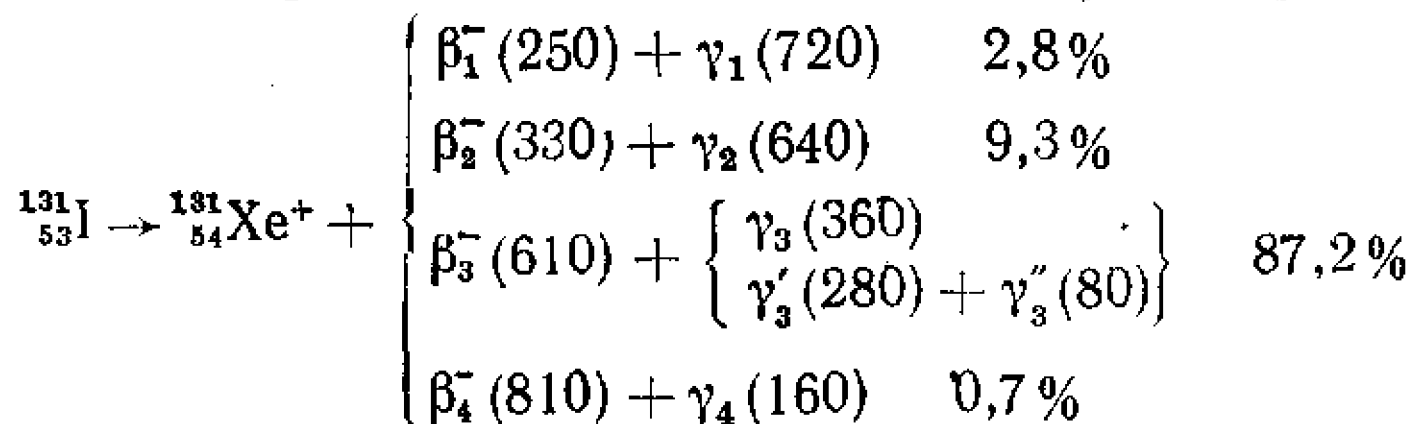
порядка нескольких килоэлектронвольт, т. е. близка к энергии β -частиц трития.

Таким образом, уравнение радиоактивного превращения ^{125}I можно записать более полно:



Поскольку и здесь энергия выделяется, это превращение можно тоже именовать радиоактивным распадом.

Мы рассмотрели самые простые случаи радиоактивного распада. Как правило, картина оказывается более сложной. Например, в практически интересном случае радиоактивного распада изотопа ^{131}I процесс может пойти по одному из вариантов:



В круглых скобках указаны энергии соответствующих излучений в килоэлектронвольтах. Справа приведено процентное соотношение разных путей радиоактивного распада ^{131}I . Заметим, что распад здесь идет по первому из рассмотренных вариантов. ^{131}I имеет четыре «лишних» нейтрона; трансмутация идет «вправо», с образованием иона элемента, следующего за иодом в периодической таблице (ксенон). Поэтому значки β_{1-4}^- здесь обозначают β -электроны ядерного происхождения. Однако, в отличие от рассмотренных выше более простых случаев, эти электроны могут иметь четыре значения энергии — от 250 до 810 КэВ. Остальной избыток ядерной энергии после трансмутаций уносит γ -излучение. Легко заметить, что сумма энергий β^- - и γ -излучений при любом из путей радиоактивного распада ^{131}I — равна 970 КэВ; это и есть избыток энергии ядра при трансмутации.

Важно подчеркнуть, что, в отличие от описанных ранее « β -излучателей», ^{131}I не имеет непрерывного энергетического спектра β -излучения. Его «спектр» — линейчатый. Он образован всего четырьмя линиями возможных энергий β -частиц: 250, 330, 610 и 810 КэВ; третья из них (610 КэВ) является доминирующей. γ -излучения тоже образуют дискретный набор, состоящий из шести возможных энергий в диапазоне от 80 до 720 КэВ.

Сопоставим характер радиоактивности двух используемых в биохимии изотопов иода: ^{125}I — мягкое γ -излучение (35 КэВ) электроны Оже с малой энергией и рентгеновское излучение; ^{131}I — шесть типов довольно жесткого γ -излучения (80—720 КэВ) и четыре типа β -частиц значительной энергии (250—810 КэВ), из которых почти $9/10$ обладают энергией в 610 КэВ, что примерно совпадает с наиболее вероятной энергией β -частиц радиоактивного фосфора (^{32}P).

Скорость радиоактивного распада

Выше было сказано, что рано или поздно каждый атом радиоактивного изотопа обречен на катастрофическую перестройку своего неустойчивого ядра, т. е. на радиоактивный распад. Но что значит «рано или поздно»? В следующую секунду или через тысячелетие? Радиоактивный распад происходит спонтанно. Длительность существования неустойчивого ядра каждого отдельного атома любого изотопа — величина неопределенная. Это существование действительно может окончиться через секунду, а может продлиться и тысячелетие. Вопрос в том, какова *вероятность* той или иной продолжительности ожидания радиоактивного распада для данного атома.

Эта вероятность зависит от природы изотопа. Для атома ^{32}P весьма вероятно, что его распад произойдет в течение ближайшей недели, а распад ядра атома ^{14}C , скорее всего, действительно случится через 1000 лет, если не позднее. Однако эта характерная для вероятностных явлений неопределенность единичного события становится строгой закономерностью, когда в дело вступает статистика огромного числа аналогичных событий. Закономерность радиоактивного распада имеет характер экспоненциального уменьшения числа радиоактивных атомов во времени и, соответственно, числа распадов в минуту. Ее удобнее всего представлять интервалом времени, в течение которого распадается половина исходного числа атомов данного изотопа. Это — вполне определенная величина. Ее называют «периодом полураспада» и обозначают $T_{1/2}$. Она сильно варьирует от изотопа к изотопу. Так, для радиоактивного фосфора $T_{1/2}$ составляет лишь 2 недели, для трития — более 12 лет, а для радиоактивного углерода — без малого 6000 лет. Легко понять, что учет периода полураспада может оказаться очень существенным как при хранении, так и при использовании данного радиоактивного изотопа.

Суммарная радиоактивность препарата

Это — наиболее важная для экспериментатора характеристика радиоактивного препарата. Она зависит как от числа радиоактивных атомов, так и от характерной для них скорости распада. В целом суммарную радиоактивность характеризуют числом радиоактивных распадов, происходящих во всей массе данного препарата за 1 мин (расп./мин). Радиоактивность до последнего времени выражали в международных единицах кюри (Ки) или их тысячных (мКи) и миллионных (мкКи) долях. По определению, $1 \text{ Ки} = 2,2 \times 10^{12}$ расп./мин. Недавно в системе СИ за единицу радиоактивности был принят Беккерель (Бк). Это — очень малая величина, отвечающая одному радиоактивному распаду в секунду, поэтому $1 \text{ Ки} = 3,7 \times 10^{10}$ Бк.

Диапазон радиоактивностей практически используемых биохимических препаратов лежит в пределах от долей микроюри до нескольких миллиюри. Это определяется условием надежности просчета радиоактивности (см. ниже).

Удельная радиоактивность (УА)

Эта характеристика радиоактивного препарата связана со скоростью его распада. «Удельной» называют радиоактивность одного миллимоля данного изотопа. Напомним, что в миллимоле любого вещества содержится $6,06 \times 10^{20}$ атомов. Понятно, что чем быстрее идет радиоактивный распад (чем меньше $T_{1/2}$), тем больше УА данного изотопа.

Рассматривая табл. 2, можно сделать выводы о преимуществах и недостатках включенных в нее изотопов с точки зрения экспериментатора:

^{14}C — прекрасно хранится; β -электроны имеют неплохой уровень энергии, но УА препаратов, меченных по углероду, очень мала по сравнению с другими изотопами.

^3H — хранится неплохо; УА почти в 500 раз больше, чем у ^{14}C , но энергия β -электронов (а значит, и их проникающая способность) очень мала.

^{35}S — очень высокая УА, причем энергия β -электронов даже чуть больше, чем у ^{14}C ; зато хранится препарат довольно плохо — за 3 мес хранения его активность снижается вдвое.

^{32}P — колоссальная УА, очень большая энергия β -частиц, но крайняя недолговечность: меченные по фосфору препараты хранить нельзя.

^{125}I — мягкое γ -излучение (с небольшой примесью электронов Оже), очень высокая УА при краткости «жизни»; по последним двум параметрам близок к ^{35}S .

^{131}I — наибольшая УА; β -частицы и γ -излучение в виде дискретного спектра излучений довольно высокой энергии, однако хранение изотопа исключается.

Это сопоставление помогает сделать выбор изотопов для решения различных экспериментальных задач. Там, где есть воз-

Таблица 2. Основные физические параметры радиоактивных изотопов, наиболее широко употребляемых при биохимических исследованиях

Изотоп	$T_{1/2}$	УА, Ки/ммоль	Энергия, КэВ	
			β -частиц (E_{max})	γ -излучения
^3H	12,3 лет	29	19	—
^{14}C	5730 лет	62 (мКи/ммоль)	156	—
^{35}S	87,4 сут	1 500	167	—
^{32}P	14,3 сут	9 000	1708	—
^{125}I	60 сут	2 000	6	35
^{131}I	8,0 сут	16 000	250—810	80—720

возможность использовать в опыте более или менее значительное количество радиоактивного препарата, предпочтение отдают долго хранящимся ^{14}C и ^3H . Для очень малых количеств препаратов в современных микрометодах исследования, несмотря на трудности с их доставкой и хранением, используют, в основном, радиоактивные серу, фосфор и иод.

Выбор изотопа часто диктуется биохимической спецификой эксперимента. Ясно, что радиоактивную метку в нуклеиновые кислоты удобно вводить через фосфор, за синтезом белка можно следить путем использования меченного ^{35}S метионина, а в готовые белки, например при иммунохимических исследованиях, вводить метку с высокой УА удобнее всего путем присоединения радиоактивного иода по остаткам тирозина.

До сих пор речь шла об УА «чистых» атомов изотопа. Если они входят в состав молекул, то в том случае, когда каждая молекула содержит только один радиоактивный атом, ее УА будет точно такой же, но ее, очевидно, надо указывать в кюри или милликюри на миллимоль радиоактивного вещества. Если в состав одной молекулы входит несколько радиоактивных атомов, то молекулярная УА может быть в несколько раз больше, чем атомная для данного изотопа. Часто имеет место обратная ситуация: в препарате, наряду с молекулами, содержащими радиоактивные атомы, есть и нерадиоактивные («холодные») молекулы. Нередко в интересах экономии радиоактивные препараты разбавляют «холодными» препаратами того же состава. В этих случаях молекулярная УА может быть значительно ниже, чем приведенные в таблице значения.

Иногда УА препарата выражают не в кюри или распадах в минуту, а числом импульсов в минуту (имп./мин), которые регистрирует прибор. Нередко это число относят не к одному миллимолю, а к миллиграмму или микрограмму вещества (например, имп./мин/мг). Строго говоря, такое выражение для УА некорректно. Как будет видно из дальнейшего, число импульсов в минуту, регистрируемое счетчиком радиоактивности, может быть значительно меньше, чем число распадов в минуту. При этом соотношение между ними зависит от способа приготовления образца для счета, настройки прибора и ряда других факторов, не имеющих прямого отношения к собственно радиоактивности препарата. Тем не менее, такое выражение может оказаться удобным для сравнительных измерений, например для наблюдения за ходом очистки индивидуального, радиоактивно меченного белка, когда измеряемую радиоактивность (в имп./мин) относят к суммарному количеству белка, содержащегося в препарате на разных этапах его очистки.

Радиоактивные изотопы без носителя

Так называют соединения с максимально возможной УА, предназначенные для введения метки в белки и нуклеиновые кислоты в опытах с микроколичествами соответствующих био-

полимеров, например $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ или раствор «чистого Na^{125}I » в 0,1 М NaOH. Слова «Без носителя» означают, что в ходе приготовления веществ к ним не было добавлено никаких «холодных» примесей. Однако это не значит, что УА таких соединений достигают предельных значений, указанных в табл. 2. Во-первых, реакции образования изотопов путем облучения в атомных реакторах идут далеко не со 100%-ным выходом; во-вторых, эти реакции фирмы-изготовители обычно проводят не чаще, чем один раз в две недели, так что к моменту отправки потребителю препарат уже хранился (и распадался) на складе в течение нескольких дней. УА₀ препарата в его паспорте указывается на день отправки заказчику. Дальнейшее снижение УА заказчик может оценить сам, исходя из паспортных данных препарата, для чего можно воспользоваться следующим соотношением:

$$\text{УА} = \text{УА}_0 / e^{0,693t/T_{1/2}} \quad \text{или} \quad \text{УА} = \text{УА}_0 / 2^{t/T_{1/2}}.$$

Здесь t — время в сутках, прошедшее с того момента, для которого фирмой было указано значение УА₀; $T_{1/2}$ — период полураспада данного изотопа, тоже в сутках.

Между прочим, полезно бывает учесть и распад ^3H , особенно если радиоактивный препарат долго хранился в лаборатории. Значение t и $T_{1/2}$ в этом случае выражают в годах.

В СССР заказы и получение радиоактивных изотопов производятся через всесоюзную контору «Изотоп». За рубежом основными поставщиками радиоактивных биохимических препаратов являются фирмы «Amersham» (Англия) и «NEN» (США, филиал в ФРГ).

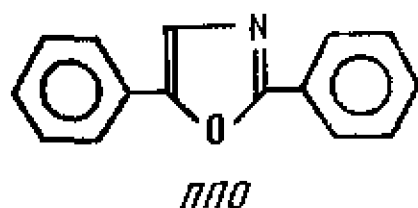
СЦИНТИЛЛЯТОРЫ

Сцинтилляцией называют свечение (флюоресценцию) вещества (сцинтиллятора), возникающее в результате передачи его молекулам энергии проникающего в вещество радиоактивного излучения. Для регистрации этого весьма слабого свечения используются высокочувствительные оптико-электронные устройства — фотоумножители (ФЭУ). Сцинтилляторы могут быть твердыми. В этом случае источник радиоактивного излучения остается вне сцинтиллятора. Для биохимических исследований часто используют сравнительно «мягкое» β -излучение. Энергия β -частиц в этом случае невелика (даже у ^{32}P), так что они плохо проникают внутрь твердого сцинтиллятора. Поэтому в биохимических исследованиях такие сцинтилляторы используются практически только для регистрации хорошо проникающего γ -излучения. Под действием этого излучения в самом сцинтилляторе возникают так называемые «вторичные» электроны, которые и возбуждают сцинтилляцию. Подробнее об этом сказано ниже, а сейчас обратимся к широко используемым для регистрации радиоактивности биологических препаратов жидким сцинтилляторам.

Жидкие сцинтилляторы

В этом случае радиоактивное соединение должно быть растворено в сцинтилляторе или хотя бы находиться с ним в столь тесном контакте, что большая часть испускаемых при радиоактивном распаде β -частиц окажется в сцинтилляторе. Нередко сцинтилляторами называют толуол, ксилол или раствор нафталина в диоксане. Это не совсем удачно. Мы будем называть перечисленные вещества «ароматическими растворителями». Дело в том, что в современных высокоэффективных жидких сцинтилляторах акты первичного поглощения энергии β -частицы и «высвечивания» этой энергии разделены не только во времени, но и между различными веществами. Функцию поглощения энергии β -частицы выполняют ароматические молекулы растворителя. Они образуют сплошную жидкую среду (толуол, ксилол) или находятся в растворе в высокой (6—10%) концентрации (нафталин). Следуя своей траектории пролета через растворитель, β -частица сталкивается с множеством таких молекул, отдавая при каждом столкновении часть своей энергии, пока не израсходует ее полностью. Число столкновений велико и тем больше, чем больше начальная энергия β -частицы. В случае ^3H оно равно в среднем 30, для ^{14}C — примерно в 10 раз, а для ^{32}P — в 100 раз больше. Около 90% таких столкновений имеют своим следствием рассеивание переданной энергии в виде тепла, но остальные 10% приводят к возникновению «возбужденных» состояний молекул растворителя (« π -возбуждение»), для которых характерен строго определенный (для данного вещества) избыток энергии его электронов. Возбужденное состояние неустойчиво, его «время жизни» невелико — в среднем через 10^{-9} — 10^{-8} с «лишняя» энергия испускается в виде кванта короткого ультрафиолетового излучения.

Собственно говоря, этим выполняются обе задачи, стоящие перед сцинтиллятором. Однако коротковолновое УФ-излучение трудно зарегистрировать. Оно, например, не проникает через стекло флакона, в котором находится сцинтиллятор. Поэтому вводят дополнительный этап трансформации первоначального возбуждения молекул растворителя, который приводит к высвечиванию в более приемлемой области спектра. Для этой цели в раствор вносят дополнительные вещества, тоже ароматического характера, но более сложной структуры, которые мы и будем называть собственно сцинтилляторами.



Примером может служить 2,5-дифенилоксазол, или, как его принято сокращенно обозначать, ППО (в английской литературе — PPO). Главная особенность ППО заключается в том, что

энергия возбуждения его молекул заметно ниже, чем у любого из названных выше ароматических растворителей. Соответственно меньше и энергия испускаемого кванта света, т. е. больше длина его волны. Максимум спектра флюоресценции ППО лежит вблизи 363 нм.

Сцинтиллятор вносят в небольшой концентрации — примерно 0,5%. Поэтому, казалось бы, вероятность того, что β -частица столкнется с молекулой ППО, невелика, и участие его в явлении сцинтилляции должно быть весьма скромным. Однако это не так. Оказывается, что практически все высвечивание энергии возбуждения молекул растворителя идет через ППО! Чтобы понять, каким образом это происходит, вспомним, что «время жизни» возбужденного состояния молекул ароматического растворителя равно 10^{-9} — 10^{-8} с. Между тем, время между двумя столкновениями каждой молекулы растворителя с другими молекулами совсем ничтожно — порядка 10^{-13} с. Это означает, что, еще находясь в возбужденном состоянии, молекула растворителя почти наверняка столкнется с другой, скорее всего невозбужденной молекулой. Суть дела в том, что при таких столкновениях очень часто энергия возбуждения передается от одной молекулы к другой. Последняя также находится в возбужденном состоянии в течение 10^{-9} с и за это время испытывает множество соударений, в ходе которых передает свою избыточную энергию следующей молекуле, и т. д. Таким образом, энергия возбуждения мигрирует (без высвечивания!) от молекулы к молекуле по всему объему растворителя.

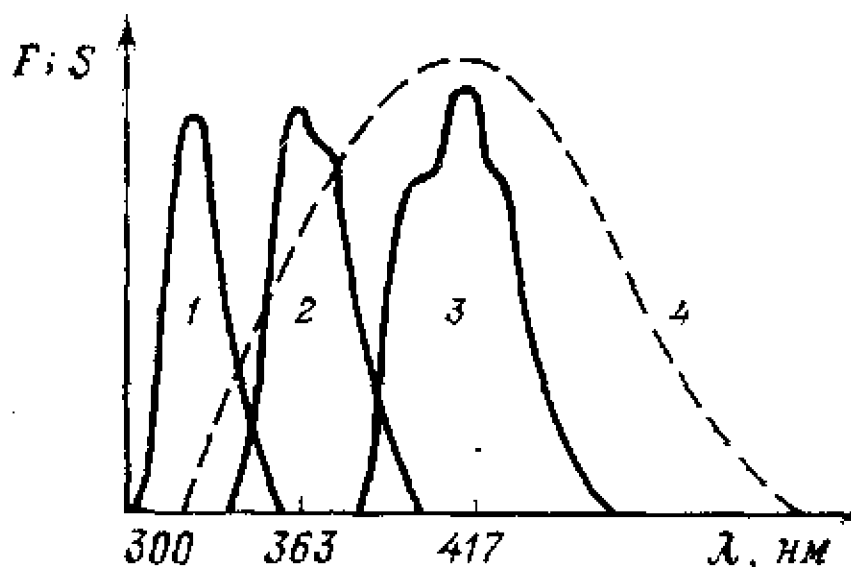
Рано или поздно (но в масштабах тех интервалов времени, которые названы выше) произойдет столкновение и передача энергии от молекулы растворителя к молекуле сцинтиллятора. Как мы отметили, энергия возбуждения сцинтиллятора меньше, чем растворителя. Излишек энергии превратится в тепло, а молекула ППО окажется в возбужденном состоянии. В этом состоянии она тоже будет испытывать множество соударений с молекулами растворителя, но передать им свою «лишнюю» энергию не сможет, так как для возбуждения молекулы растворителя необходима большая энергия, чем та, которой располагает молекула сцинтиллятора. Его молекулы выполняют, таким образом, роль «ловушек» энергии возбуждения. Очень быстро вся энергия, переданная β -частицей в виде возбуждения молекулам растворителя, будет захвачена «ловушками». Не имея возможности избавиться от этой энергии путем столкновений, молекулы сцинтиллятора по истечении времени жизни своего возбужденного состояния будут высвечиваться с более приемлемой для регистрации длиной волны.

Может возникнуть вопрос — а не использовать ли для регистрации радиоактивного β -распада чистый сцинтиллятор? Но ППО — твердое вещество, и растворитель здесь необходим.

Длина волны флюоресценции ППО была названа нами «более приемлемой». И все же она тоже слишком коротка. Макси-

Рис. 47. Соотношение спектров флюоресценции толуола (1), ППО (2) и ПОПОП (3) с типичной кривой спектральной чувствительности ФЭУ (пунктир)

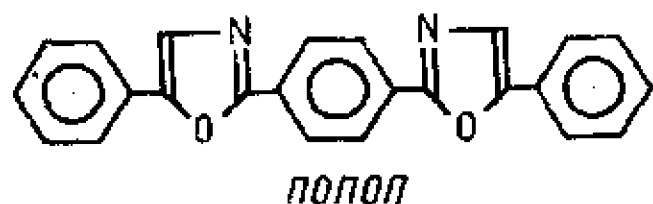
F — интенсивность флюоресценции; S — чувствительность ФЭУ (в условных единицах)



мум спектральной чувствительности ФЭУ лежит в области 390—460 нм, т. е. в еще более длинноволновой, чем максимум флюоресценции ППО, хотя перекрывание их спектров имеет место (рис. 47).

Для обеспечения дальнейшего сдвига спектра флюоресценции в длинноволновую область в раствор вводят еще один сцинтиллятор — «вторичный» (ППО в этом случае можно именовать «первичным» сцинтиллятором). Это — еще более сложное ароматическое соединение, с еще более низким уровнем энергии возбуждения; его спектр флюоресценции соответственно сдвинут еще «правее» (см. рис. 47). Передача энергии возбуждения от первичного сцинтиллятора к вторичному идет, в основном, по тому же, описанному выше механизму. Опять-таки может возникнуть вопрос о полной замене одного сцинтиллятора на другой. Однако это невозможно ввиду очень малой растворимости вторичных сцинтилляторов. Обычно их используют в концентрациях около 0,01 %.

Среди вторичных сцинтилляторов наибольшее распространение получил *n*-бис[2-(5-фенилоксазоил)]бензол, или, как его сокращенно называют, ПОПОП (англ. ROROP). Максимум флюоресценции ПОПОП лежит вблизи 417 нм. Диметил-ПОПОП (CH₃-группы в положениях 4 обоих колец оксазола) несколько лучше растворим, чем ПОПОП, и столь же эффективен. Есть еще целый ряд соединений, разработанных фирмами, стремящимися максимально повысить эффективность счета (см. ниже) в предлагаемых ими сцинтилляторах. Впрочем, выигрыш оказывается очень невелик.



Отметим только своеобразный сцинтиллятор «Butyl PBD» фирмы «NEN». По уровню энергии возбуждения и длине волны флюоресценции он приближается к рассмотренным вторичным сцинтилляторам, однако его растворимость в толуоле достигает 61 г/л при 0°.

Рецепты приготовления различных сцинтилляторов в лабораторных условиях, а также марки и характеристики готовых продажных сцинтилляторов приведены ниже. Сейчас же, в заключение первого знакомства с явлением сцинтилляции, обратим внимание на то важное обстоятельство, что хотя β -частица на своем пути испытывает сотни и тысячи следующих друг за другом соударений, скорость ее полета столь велика, а время трансформации этих соударений в импульсы света столь мало, что при каждом прохождении β -частицы через сцинтиллятор фотумножитель регистрирует только один «слитный» импульс света. На этом и базируется возможность счета числа β -частиц, испускаемых радиоактивным препаратом.

Спектр интенсивностей световых импульсов

Световой импульс, отвечающий пробегу через сцинтиллятор одной β -частицы, образуется совокупностью фотонов примерно одинаковой энергии (и длины волны — в пределах спектра флюоресценции), поскольку все они обязаны своим происхождением возбуждению одних и тех же молекул вторичного сцинтиллятора. Энергия этих фотонов не зависит от начальной энергии β -частицы. От нее зависит число соударений, а следовательно, и число фотонов — иными словами, интенсивность светового импульса.

Итак, интенсивность светового импульса пропорциональна начальной энергии β -частицы. Отсюда можно заключить, что

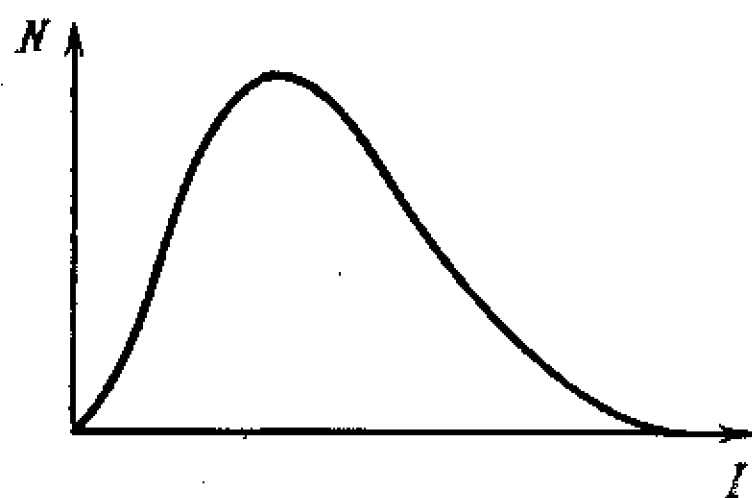


Рис. 48. Спектр распределения световых импульсов (сцинтилляций) по их интенсивностям

N — число вспышек за единицу времени; I — интенсивность света

распределение (спектр) числа световых импульсов за единицу времени по их интенсивности должно в точности повторять по своей форме распределение числа актов радиоактивного распада (имп./мин) по энергиям β -частиц, т. е. энергетический спектр излучения, изображенный на рис. 45. Такой спектр световых импульсов, уже в виде огибающей, представлен на рис. 48.

Эффективность счета радиоактивности

Описанный способ регистрации числа β -частиц путем учета числа вспышек сцинтилляции не является эффективным на 100%: не все β -частицы будут при этом зарегистрированы. Во-

первых, некоторые из них могут растратить всю свою энергию на тепловые соударения, так и не возбудив ни одной молекулы растворителя. Во-вторых, иные световые импульсы могут оказаться настолько слабыми, что их не удастся обнаружить на фоне «шума» ФЭУ и следующих за ним электронных усилительных устройств. Наконец, две β -частицы могут вылететь из радиоактивного препарата одновременно или со столь малым сдвигом по времени, что ФЭУ регистрирует один общий световой импульс, т. е. одну частицу вместо двух.

Однако при достаточно большом числе актов радиоактивного распада все эти ошибки приобретают статистически постоянный характер; при этом строго сохраняется *пропорциональность* числа световых импульсов числу β -частиц. Снижается лишь «эффективность счета» числа β -распадов. Далее будут рассмотрены способы оценки этой эффективности. Она определяется многими факторами, в том числе качеством сцинтиллятора и чувствительностью счетчика радиоактивности. Современные сцинтилляторы, приборы и методы счета радиоактивности позволяют регистрировать β -излучение радиоактивного углерода с эффективностью около 95%; в то же время, для трития максимальная эффективность не превышает 60%. Отсюда видно, что эффективность счета радиоактивности зависит и от природы изотопа — в частности, от средней энергии испускаемых им β -частиц.

Количественно эффективность счета радиоактивности (в данной постановке опыта) характеризуют отношением числа световых импульсов в минуту, которые регистрирует прибор (N , имп./мин), к числу радиоактивных распадов в исследуемом образце за это же время (D , расп./мин): $E = N/D$.

Разумеется, число распадов в минуту в препарате (D) должно быть известно из каких-либо иных источников. В английской литературе это же соотношение записывают так: $E = \text{cpm/dpm}$ (соответственно «counts per minute» и «decompositions per minute»).

Тушение сцинтилляции

Это явление проявляется в снижении числа регистрируемых световых импульсов и уменьшении их интенсивности за счет присутствия в сцинтилляторе или радиоактивном препарате некоторых примесей. Особенно опасны вещества, молекулы которых способны возбуждаться подобно сцинтилляторам, но не высвечиваются, а рассеивают энергию возбуждения целиком в виде тепла. Они тоже выступают в роли «ловушек» энергии, мигрирующей в растворителе, и конкурируют в этом плане с молекулами сцинтиллятора, поэтому создаваемый ими эффект «тушения» проявляется, несмотря на очень малое содержание «тушителя». Тушители могут иметь биологическое происхождение и вноситься вместе с препаратом. Иногда они содержатся в растворителе (ацетоне, этаноле, ТХУ), а также появляются в

самом сцинтилляторе (например, перекиси в диоксиде). Такое явление называют химическим тушением. Тушение может иметь место и в результате поглощения света сцинтилляций окрашенными примесями, особенно красными и желтыми красителями и пигментами (оптическое тушение). Вследствие тушения некоторые столкновения каждой β -частицы с молекулами растворителя оказываются неэффективными в отношении трансформации их в световые импульсы и регистрации последних. В результате этого интенсивности всех световых вспышек уменьшаются, а общее число регистрируемых импульсов снижается за счет тех из них, которые и без тушения были слабыми. Спектр световых импульсов становится ниже и сдвигается влево — к меньшим интенсивностям (рис. 49).

Регистрация γ -излучения. Твердые сцинтилляторы

Лишенное заряда, электромагнитное γ -излучение легко проникает внутрь вещества. Для его регистрации удобно использовать твердые сцинтилляторы, не нуждающиеся в замене и лучше поглощающие γ -лучи. Чаще всего для этой цели применяют монокристаллы иодистого натрия, выращенные с добавкой около 0,1% иодистого теллура. Собственно говоря, само свечение здесь тоже вызывается электронами, возбуждающими молекулы сцинтиллятора. Но теперь эту функцию выполняют так называемые «вторичные» электроны, порождаемые взаимодействием γ -излучения с веществом сцинтиллятора.

Вторичные электроны появляются в результате протекания двух различных физических явлений. Первое из них — это *фотоэффект*. Вся энергия γ -кванта передается одному из наружных электронов атома сцинтиллятора. Электрон вырывается из оболочки атома и начинает двигаться со скоростью, которая соответствует разности энергии γ -кванта и энергии связи электрона с атомом. На своем пути этот электрон сталкивается с другими молекулами сцинтиллятора и возбуждает их, как описано выше. Затем следует высвечивание энергий возбуждения и регистрация суммарного светового импульса с помощью ФЭУ. Коль скоро энергия γ -излучения, проникающего в сцинтиллятор, определена, то строго определенное значение имеет и начальная энергия каждого из электронов, возникающих в результате фотоэффекта. Соответственно и в спектре световых импульсов этим электронам будут отвечать полосы, лежащие в узких диапазонах интенсивностей (рис. 50).

Второй физический эффект, обуславливающий появление способных вызвать сцинтилляцию электронов, — это *эффект Комптона*. Его механизм схематически поясняет рис. 51. γ -Квант в этом случае испытывает «упругое соударение» со свободным, находящимся вне кристаллической решетки электропроводящего сцинтиллятора электроном. Часть энергии γ -кванта переда-

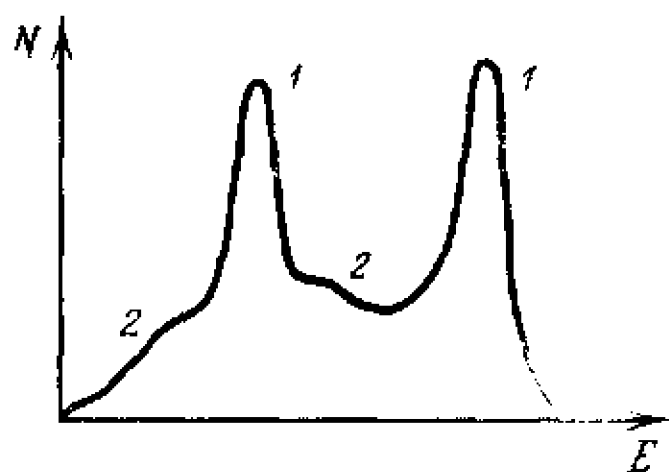
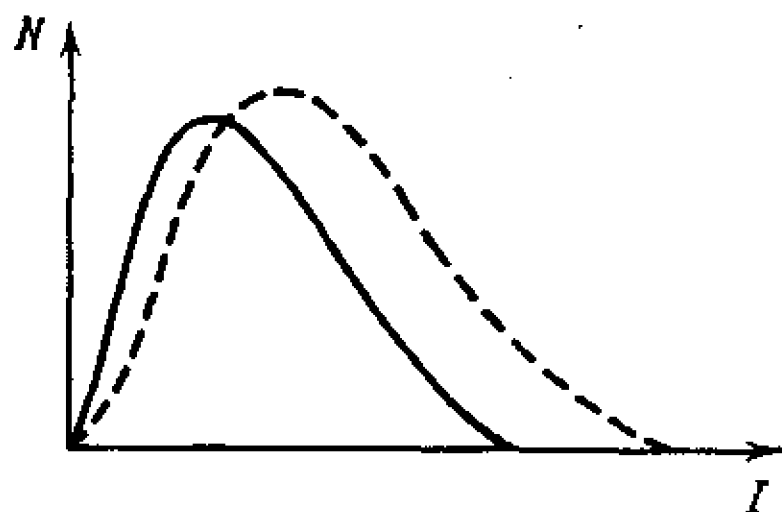


Рис. 49. Изменение спектра сцинтилляций в результате тушения

Пунктир — исходный спектр без тушения; сплошная линия — тот же спектр в присутствии тушителя; обозначения — см. рис. 48.

Рис. 50. Спектр распределения сцинтилляций при регистрации γ -излучения с помощью твердого сцинтиллятора

E — энергия вторичных β -частиц; 1 — сцинтилляции от фотоэлектронов; 2 — от комптоновских электронов

ется электрону, а сам γ -квант, уже с меньшей энергией, изменив, подобно бильярдному шару, направление своего распространения, продолжает движение в толще сцинтиллятора, испытывая все новые соударения, пока не израсходует весь свой запас энергии или не покинет пределы сцинтиллятора. В соответствии со случайным характером таких соударений на пути γ -кванта возникает целая серия «комптоновских электронов», энергии которых перекрывают широкий интервал значений. Эти электроны тоже порождают вспышки сцинтилляций и образуют сплошной спектр световых импульсов, заполняющий на рис. 50 весь диапазон интенсивностей свечения, вплоть до максимального значения, отвечающего полной энергии γ -кванта (при «лобовом» соударении). В силу точно выполняющихся статистических законов такой спектр носит не случайный характер, а строго соответствует природе сцинтиллятора и характеру γ -излучения.

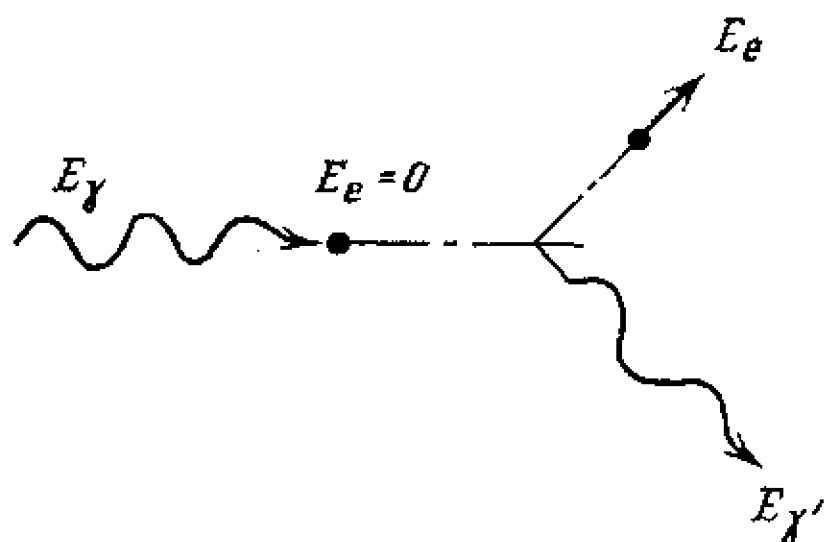


Рис. 51. Эффект Комптона

E_γ , $E_{\gamma'}$ — энергия γ -кванта до и после соударения с электроном; E_e — энергия поступательного движения электрона

Эффективность регистрации γ -излучения всегда меньше 100%, так как часть γ -квантов покидает сцинтиллятор, не испытав ни одного «плодотворного» столкновения. В связи с этим толщину монокристалла сцинтиллятора желательно увеличи-

вать. В современных счетчиках γ -излучения используют кристаллы толщиной до 75 мм.

В твердых сцинтилляторах нет тушения, поскольку сами они изготавливаются очень чистыми, а препарат остается вне сцинтиллятора. Твердый сцинтиллятор не регистрирует внешнего β -излучения, даже от ^{32}P , так как его обычно помещают в защитный алюминиевый кожух.

Для регистрации γ -излучения, вообще говоря, пригодны и жидкие сцинтилляторы. В них разыгрываются точно такие же процессы генерирования и регистрации вторичных электронов, как в твердых сцинтилляторах, хотя и с заметно меньшей эффективностью. Зато с помощью жидких сцинтилляторов можно регистрировать одновременно γ - и β -излучение в препаратах, несущих «двойную» радиоактивную метку. Впрочем, имеются фирменные смеси жидких сцинтилляторов, которые почти не уступают твердым при регистрации мягкого γ -излучения (см. ниже). В таких смесях можно просчитывать радиоактивность ^{125}I с эффективностью до 60% одновременно со счетом радиоактивности ^3H или ^{14}C . При этом регистрируются и электроны Оже.

ПРИНЦИПЫ УСТРОЙСТВА ЖИДКОСТНОГО СЦИНТИЛЛЯЦИОННОГО СЧЕТЧИКА

Фотоумножитель

Как уже упоминалось, регистрация световых импульсов осуществляется с помощью специальных высокочувствительных электровакуумных устройств — фотоэлектронных умножителей (ФЭУ). Познакомимся в самых общих чертах с принципом их работы.

Схема ФЭУ изображена на рис. 52. Импульсы света попадают на фотокатод, покрытый специальным составом, который под действием этих импульсов испускает электроны (фотоэффект). Воздух из трубки ФЭУ удален. Вдоль ее длины, чередуясь по двум противоположным сторонам, размещены изогнутые металлические пластинки — диноды. На них с цепочки сопротивлений делителя подается большое положительное напряжение, возрастающее от динода к диноду по мере удаления от катода. Каждый импульс света, в зависимости от своей интенсивности, высвобождает из фотокатода от нескольких штук до нескольких сотен электронов. Зарегистрировать такой «электрический ток» невозможно. Однако под действием электрического поля эти электроны устремляются к первому диноду, разгоняются и бомбардируют его поверхность. Поверхность же эта обработана таким образом, что каждый с силой ударяющий в нее электрон выбивает *несколько* вторичных электронов. Они, в свою очередь, под действием разности потенциалов между соседними динодами разгоняются и бомбардируют следующий динод. Число вылетающих электронов нарастает лавинообразно, так что

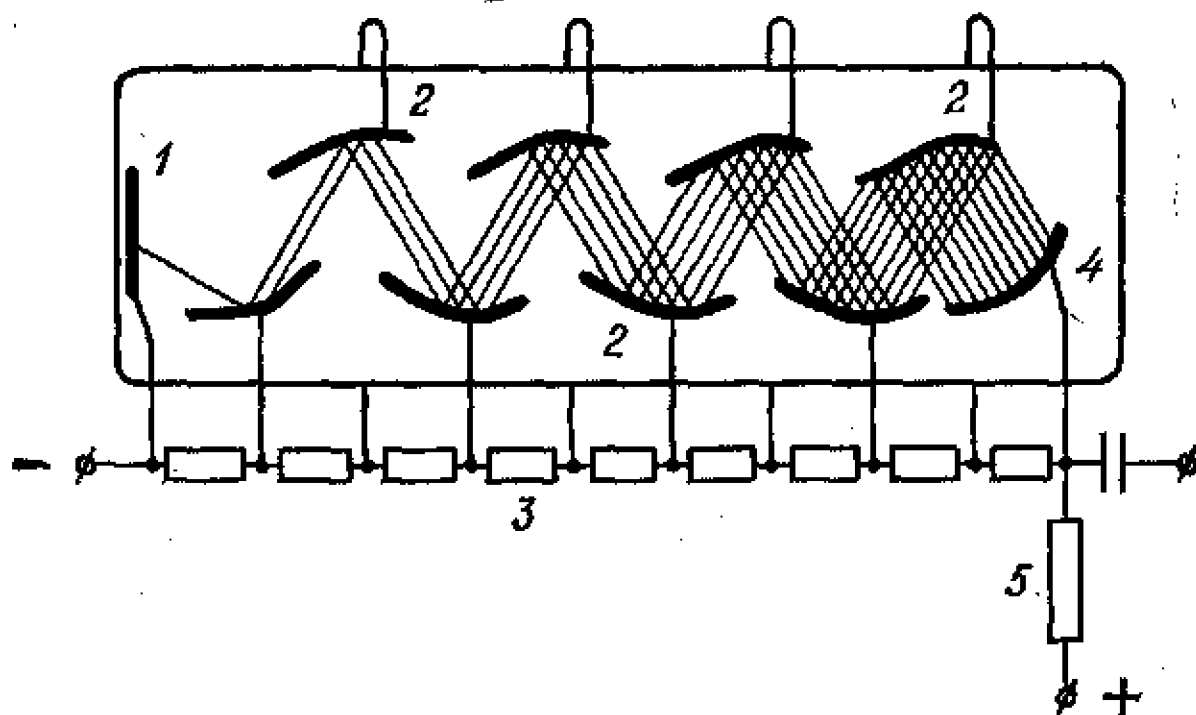


Рис. 52. Принципиальная схема ФЭУ

1 — фотокатод; 2 — диноды; 3 — делитель напряжения; 4 — анод; 5 — выходное сопротивление

их поток, попадающий в ходе регистрации одного светового импульса на последний электрод (анод), несет в себе 10^9 — 10^{11} электронов. Это — уже электрический ток! Выходя из ФЭУ и протекая по сопротивлению «анодной нагрузки», он создает на нем импульс напряжения, измеряемый долями вольта. Его можно зарегистрировать.

Важно отметить, что по самой сути описанного процесса амплитуда импульса напряжения «на выходе» ФЭУ строго пропорциональна числу первичных электронов, вылетевших из фотокатода, а следовательно, и интенсивности светового импульса (числу фотонов, генерируемых β -частицей). Что же касается числа импульсов напряжения и скорости их следования, то они будут точно такие же, как у световых импульсов. С «запаздыванием» импульсов напряжения можно не считаться, так как описанные электронные процессы протекают чрезвычайно быстро.

Итак, ФЭУ преобразует световые импульсы в импульсы напряжения, причем амплитуды последних строго пропорциональны интенсивности первых, а следовательно, и начальным энергиям возбуждающих сцинтилляцию β -частиц.

Линейные и логарифмические усилители

Хотя амплитуды импульсов напряжения на выходе ФЭУ уже можно измерить, но для дальнейших манипуляций их имеет смысл еще усилить. Усиление осуществляется чисто электрическим путем в электронных усилителях. Познакомимся с двумя типами используемых для этой цели усилителей.

Наиболее естественными кажутся так называемые «пропорциональные» или «линейные» усилители. В них каждый импульс напряжения, поступающий от ФЭУ, независимо от его величины, усиливается в одно и то же число раз. Это число (коэффициент усиления), разумеется, можно регулировать, не нарушая соотношения между значениями амплитуд импульсов.

В конце всей цепи электрических преобразований импульсов напряжения стоит, разумеется, счетчик числа импульсов. Среди элементов преобразования есть и такие, которые способны пропустить к счетчику только те импульсы, амплитуда которых лежит в некотором, наперед заданном интервале значений напряжения. Представим себе, что мы будем выбирать этот интервал очень узким и постепенно продвигаться с ним от максимальных значений амплитуд напряжения к нулевому, каждый раз регистрируя число импульсов в минуту, попадающих в заданный интервал амплитуд. С учетом всего сказанного нетрудно понять, что графическое изображение полученной таким образом зависимости будет иметь точно такой же вид, как приведенный на рис. 45 спектр распределения β -частиц по их энергиям (или световых импульсов по интенсивностям — см. рис. 48). Собственно говоря, только что был описан практический способ построения таких спектров.

Изобразим эту экспериментальную зависимость еще раз (рис. 53), откладывая теперь по оси абсцисс амплитуды импульсов напряжения на выходе линейного усилителя, а по оси ординат — число их в минуту, регистрируемое счетчиком. Как и на рис. 45, проведем огибающую этого графика. Это и будет используемый далее для настройки прибора и всех расчетов спектр разделения импульсов по амплитудам в случае линейного усилителя напряжений. $V_{\max}$ на рис. 53 отмечает максимальную амплитуду импульса напряжения, возникающего в результате испускания β -частицы с максимально возможной для данного изотопа энергией. Для различных изотопов характерны разные спектры. При построении в одинаковом масштабе они будут соотноситься между собой так же, как энергетические спектры на рис. 46.

Рассматривая рис. 46, можно отметить, что спектры трех представленных там изотопов «теснятся», основательно перекрываются друг с другом в области малых энергий своих β -частиц (и, соответственно, малых амплитуд напряжений на выходе линейного усилителя) и растянуты в областях, приближающихся к их максимальным энергиям. Эта форма спектров не очень удобна для разделения импульсов, идущих от двух изотопов в составе одного препарата. Такое разделение необходимо осуществить при счете «двойной изотопной метки» — в методе, колоссально расширяющем возможности исследований с использованием радиоактивных изотопов.

В этом случае на стадии усиления напряжения после ФЭУ удобно осуществить некое чисто электрическое преобразование, которое, полностью сохранив число регистрируемых импульсов, изменяет вид спектра распределения импульсов по амплитудам. Это преобразование состоит в том, что коэффициент усиления стремятся сделать неодинаковым для импульсов напряжения с различной амплитудой.

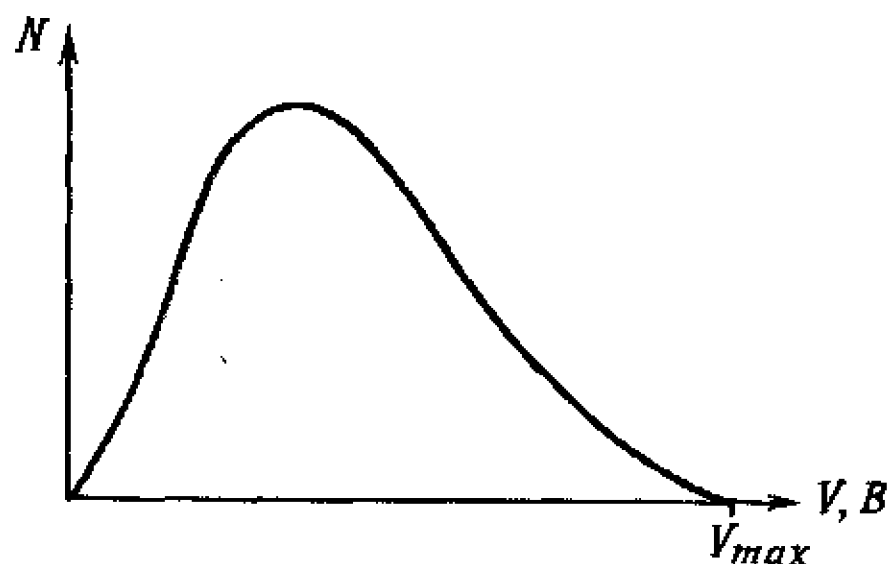


Рис. 53. Спектр распределения импульсов напряжения по их амплитуде на выходе линейного усилителя счетчика

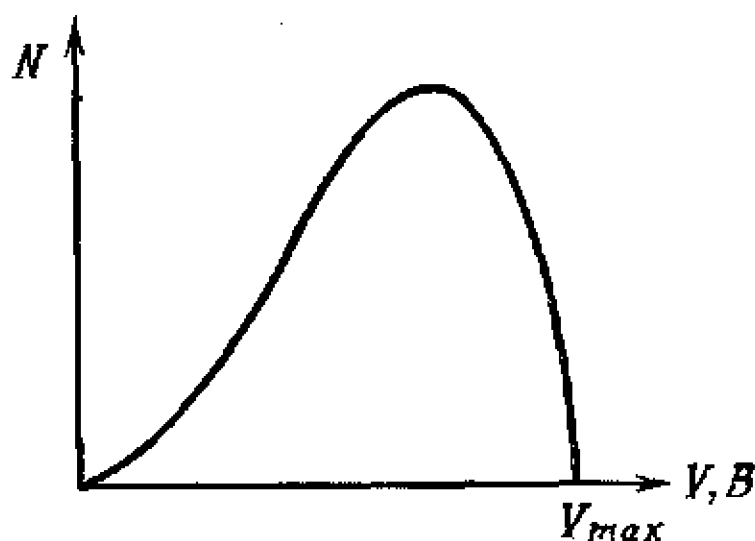


Рис. 54. Спектр распределения импульсов напряжения по их амплитуде на выходе логарифмического усилителя счетчика

Пусть, например, усилитель хорошо усиливает слабые импульсы напряжения на выходе ФЭУ и относительно плохо — сильные. Вид спектра распределения импульсов по амплитудам трансформируется следующим образом (рис. 54). В области малых амплитуд на выходе такого усилителя окажется очень немного импульсов — только те, которые изначально были уж очень малы. Основная часть импульсов переместится в область довольно значительных амплитуд. Вместе с тем, импульсы, обладавшие исходно наибольшими амплитудами, будут усиливаться слабо, поэтому область импульсов высокого напряжения в спектре на выходе усилителя сожмется, станет компактной. Именно такая, четко выраженная трансформация спектра распределения импульсов напряжения осуществляется так называемыми «логарифмическими» усилителями напряжения, т. е. такими, которые на своем выходе «выдают» импульсы, амплитуда каждого из которых пропорциональна не самой амплитуде усиливаемого импульса, а ее логарифму. Еще раз подчеркнем, что суммарное число регистрируемых импульсов при этом не изменяется.

Ограничение амплитуд импульсов. «Пороги»

Ниже будет сказано о пользе возможности отбирать для счета импульсы по их амплитудам. С этой целью разработаны электронные устройства, пропускающие в следующую за ними электрическую цепь, например, только импульсы, амплитуда которых больше некоторого заданного значения. Такие, достаточно большие импульсы напряжения как бы отпирают «калитку» (англ. «gate») или переваливают через «порог» и далее проходят уже неизменными — с полной амплитудой. Все импульсы, амплитуда которых ниже заданной, не проходят вовсе, гасятся — как бы остаются за порогом. Высоту «порога», т. е. граничную амплитуду напряжения можно регулировать, задавать заранее.

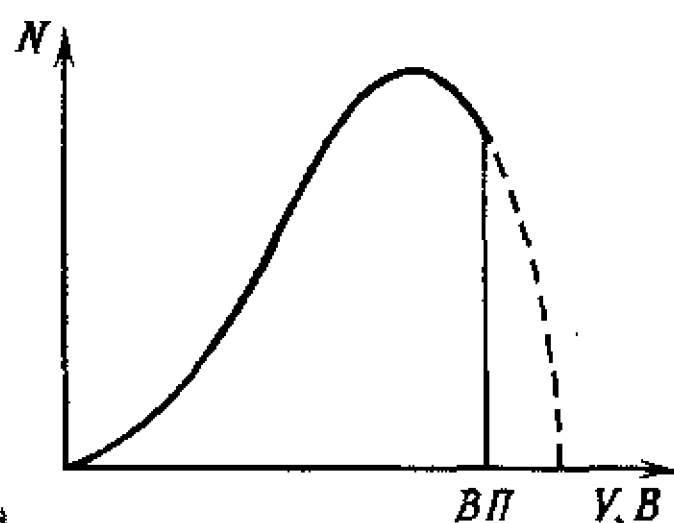
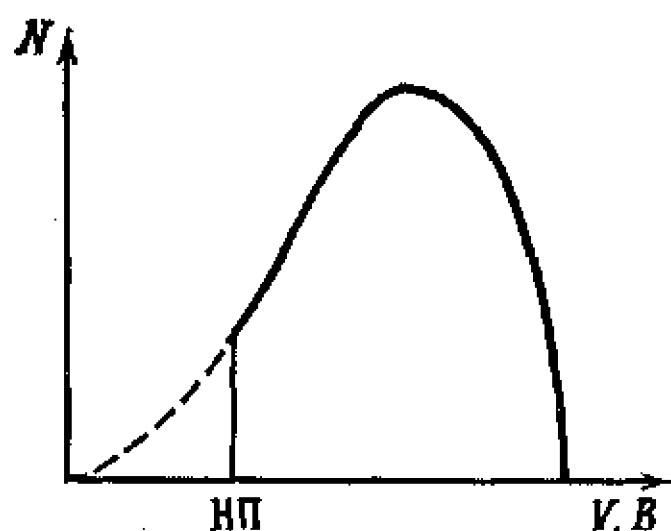


Рис. 55. Установка нижнего порога (НП) амплитуд регистрируемых импульсов

Рис. 56. Установка верхнего порога (ВП) амплитуд регистрируемых импульсов

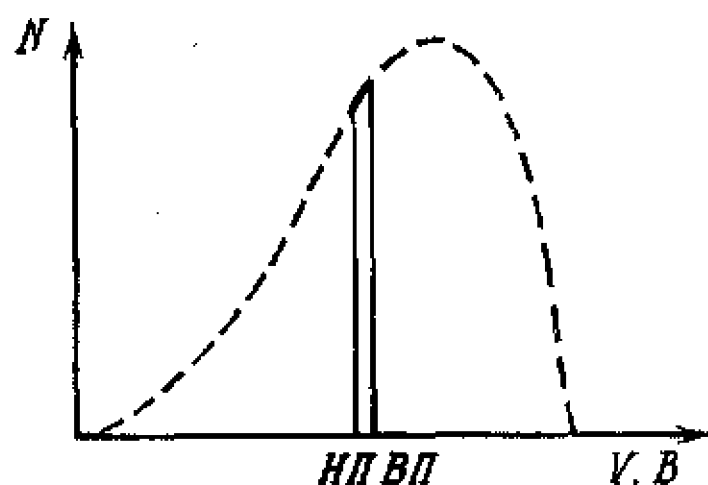


Рис. 57. Установка «окна» для регистрации импульсов почти одинаковой, наперед заданной амплитуды

Таким образом, из спектра распределения импульсов по амплитудам можно убрать целую его область, любую часть спектра со стороны малых амплитуд. Импульсы с амплитудами, соответствующими этой части спектра, перестают регистрироваться счетчиком — спектр «обрезается снизу» (рис. 55). Такую регулировку именуют «установлением нижнего порога» регистрации импульсов. На рис. 55 напряжение нижнего порога обозначено буквами «НП».

В каждом сцинтилляционном счетчике имеются и регулировочные устройства для установления «верхнего порога» регистрации импульсов. Эти устройства пропускают только такие импульсы напряжения, амплитуды которых меньше некоторого, наперед заданного и регулируемого значения. Все импульсы с большей амплитудой гасятся и не просчитываются. Спектр распределения импульсов по амплитудам при этом «обрезается сверху», со стороны максимальных амплитуд (рис. 56). Буквами «ВП» отмечено положение верхнего порога.

Значения обоих порогов устанавливаются экспериментатором независимо друг от друга с помощью отдельных верньеров с делениями, выведенных на панель прибора. Можно эти пороги раздвинуть так, что $НП=0$, а $ВП > V_{\max}$. В этом случае счетчик будет регистрировать импульсы, заполняющие весь «спектр амплитуд». Можно их сдвинуть близко один к другому, так что между ними останется лишь узкое «окно», в которое попадут импульсы почти одинаковой амплитуды — только они и будут просчитываться (рис. 57). Очевидно, что именно таким образом,

постепенно передвигая узкое «окно», снимают спектр распределения импульсов напряжения по амплитудам. О другом, более существенном использовании «порогов» будет сказано ниже.

«Шум» прибора

Общеизвестно, что и в отсутствие радиоактивного препарата современные высокочувствительные счетчики излучений регистрируют некоторое число импульсов (примерно 50 имп./мин). Этот так называемый «фон» счета импульсов обусловлен наложением многих причин, в числе которых — чисто электрический «шум» самого прибора. Одной из причин этого шума служат, например, тепловые флуктуации энергии электронов фоточувствительного слоя ФЭУ, в результате которых некоторые электроны могут вылетать из фотокатода и начинать процесс лавинообразного умножения без всякого освещения. Отличительная особенность этого «темнового шума» — примерно одинаковое (равновероятное) распределение его импульсов по амплитудам, т. е. равномерный спектр шума, простирающийся иной раз до весьма значительных амплитуд (рис. 58).

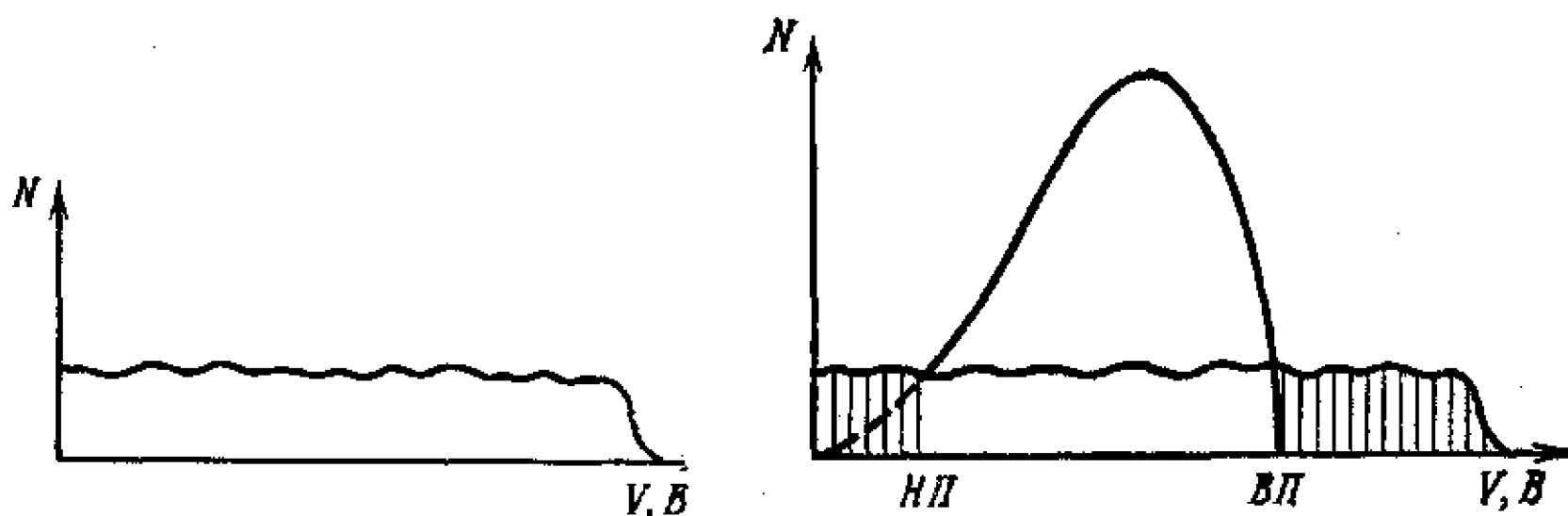


Рис. 58. Спектр распределения импульсов темнового «шума» ФЭУ по амплитудам

Рис. 59. Наложение спектров распределения по амплитудам импульсов радиоактивности и темнового шума (максимальная очистка сигнала от «шума» путем выбора порогов)

Сцинтилляционный счетчик без специальных устройств не может отличить импульсы, появившиеся в результате радиоактивного распада, от импульсов шума — он регистрирует те и другие. Два спектра распределения импульсов по амплитудам — полезный и шумовой — накладываются друг на друга (рис. 59). Из того же рисунка видно, что разумным выбором положений верхнего и нижнего порогов можно «срезать» значительную долю шумовых импульсов (они заштрихованы), почти не пожертвовав регистрацией радиоактивного излучения.

Схема совпадений

Тепловой шум ФЭУ может дать весьма основательный «вклад» в суммарный счет — до 10^5 имп./мин. Охлаждение ФЭУ снижает уровень шума, но не очень значительно — всего лишь в 3—4 раза. И если упомянутый выше уровень нормального фона современного счетчика примерно в тысячу раз меньше, то это — результат введения в систему регистрации специального устройства, которое все-таки позволяет отличить импульсы радиоактивного распада от шумовых. Правда, за это приходится заплатить немалую цену (и в буквальном смысле слова тоже) — такое устройство нуждается в установлении второго ФЭУ. Оно именуется «схемой совпадений».

Предположим, что флакон со сцинтиллятором помещен между фотокатодами двух ФЭУ, каждый из которых регистрирует световые вспышки и посылает соответствующие импульсы напряжения в цепь дальнейшего усиления. Кроме того, каждый из них посылает туда же и импульсы своего теплового шума. Казалось бы, положение ухудшается — число импульсов шума должно примерно удвоиться. Однако прежде чем поступить к усилителям, сигналы от обоих ФЭУ попадают на схему совпадений. Существо работы этой электронной схемы заключается в том, что она пропускает в следующую за ней цепь только такие пары импульсов, которые приходят на два ее входа, от двух ФЭУ строго одновременно («совпадают»). Это совсем не свойственно импульсам теплового шума. Каждый из ФЭУ «шумит» независимо от другого, и только в редчайших случаях два шумовых импульса от двух ФЭУ могут совпасть во времени и поступить на схему совпадений одновременно. Так происходит почти полное подавление шумов ФЭУ.

Совсем другая картина складывается при пролете β -частицы через сцинтиллятор. Вспомним, что при этом практически одновременно продуцируется несколько десятков, а иногда и тысяч фотонов. Симметрия расположения определяет равновероятность попадания этих фотонов на фотокатоды обоих ФЭУ. В результате два ФЭУ регистрируют одновременно два световых импульса, каждый из которых будет получен в результате попадания на фотокатод примерно половины новообразованных фотонов. Эти импульсы, трансформированные в импульсы напряжения, одновременно поступают на схему совпадений, которая и пропускает их для дальнейшего усиления и регистрации.

Технически невозможно создать электронную схему, которая будет отбирать только импульсы, попадающие на нее одновременно в буквальном смысле этого слова, поскольку существует некое «время разрешения» прибора («resolving time»). Импульсы, следующие друг за другом с интервалом, не превышающим это время, будут восприняты схемой совпадения как одновременные. В современных счетчиках время разрешения составляет

примерно 20 нс, поэтому из теплового шума ФЭУ в 10^5 имп./мин регистрируется не более 5 имп./мин.

Заметим, что схема совпадения не ослабляет фона, создаваемого внешними, посторонними источниками радиации, например космическим излучением или примесью радиоактивного изотопа ^{40}K в стекле флакона. При необходимости максимально снизить этот фон используют флаконы из безкалиевого стекла или полиэтилена. Для защиты от космических лучей применяют свинцовые экраны.

Степень подавления фона иногда характеризуют отношением $E^2/N_{\text{ш}}$, где E — максимальная эффективность счета данного изотопа в процентах, а $N_{\text{ш}}$ — уровень шума в импульсах в минуту. В английской литературе это отношение именуется «figure of merit» («индекс качества» прибора). Для счета ^3H он лежит обычно в интервале 60—100, для ^{14}C — в пределах 200—300. По абсолютному значению уровень шума (фон) с пустым флаконом составляет примерно 30 имп./мин, без флакона — около 10 имп./мин.

Уровень фона зависит от регулировки порогов усилителя (он тем меньше, чем ближе они друг к другу), от качества сцинтиллятора и особенно от чистоты флаконов, на стенках которых могут остаться радиоактивные вещества предшествовавших просчетов. Поэтому при регистрации малых радиоактивностей следует предварительно просчитать флаконы, заполненные чистым сцинтиллятором (считать пустые флаконы не имеет смысла), и далее вычитать зарегистрированные значения фона. При просчетах значительных активностей вычитают среднее значение фона, одинаковое для всех флаконов, разумеется, если есть уверенность, что среди используемых флаконов нет радиационно грязного. Вычитание среднего значения фона, заданного экспериментатором, как правило, производится автоматически самим прибором.

Счетные устройства

Число импульсов, прошедших через схему совпадения и между порогами усилителя, регистрируется электронными, быстродействующими, цифропоказывающими счетчиками. Все импульсы, достигшие счетчика, регистрируются одинаково — независимо от их амплитуды. Электронные счетчики способны регистрировать до десятков миллионов импульсов в минуту. Для удобства наблюдения за счетом они построены по десятичной схеме, так что экспериментатор непосредственно читает число импульсов, зарегистрированных с момента начала счета, даже если оно шести- или семизначное. Современный трехканальный счетчик (см. ниже) поворотом рукоятки можно переключать таким образом, что он в любой момент времени покажет число импульсов, просчитанное в любом из трех каналов.

В автоматические сцинтилляционные счетчики загружают до 400 флаконов, и они по заданной программе просчитываются

один за другим. Программа, в частности, предусматривает продолжительность счета импульсов в каждом флаконе и, если надо, повторность этих просчетов. Тот же самый счетчик может по заданию оператора указать номер просчитываемого флакона и время, прошедшее с момента начала счета радиоактивности в нем. Наконец, всякий современный счетчик радиоактивности снабжен печатающим устройством, которое регистрирует результаты счета в каждом флаконе, выдавая их в виде числа импульсов в минуту или, после соответствующей обработки этих результатов, в виде истинной радиоактивности, выраженной числом распадов в минуту. Естественно, что для такой обработки тоже надо задать определенную программу. Некоторые приемы составления таких программ и способы их введения в прибор (с помощью телетайпа, перфокарт, цифровой клавиатуры и др.) рассмотрены ниже.

Точность счета

Распад радиоактивных изотопов носит статистический характер, поэтому число импульсов в минуту для одного и того же радиоактивного препарата варьирует от просчета к просчету. Чем больше импульсов просчитывается, тем меньше эта вариация — происходит усреднение счета, точность измерения возрастает. Теория показывает, что при просчете N импульсов за любое ограниченное время ошибка по сравнению со статистически достоверной не превышает $\pm 2\sqrt{N}$. Относительную точность измерения радиоактивности принято выражать в процентах величиной $(2\sqrt{N}/N) \times 100$ или $(2/\sqrt{N}) \times 100$. Таким образом, при просчете 10 000 импульсов можно ручаться за точность $\pm 2\%$, а 100 — лишь за $\pm 20\%$. Величину $\sqrt{N}$ называют «стандартным отклонением» и обозначают σ . Можно утверждать, что достоверная величина N лежит в пределах $(N \pm 2\sigma)$. Современные счетчики автоматически вычисляют и печатают величину σ или 2σ для каждого просчета.

Вообще говоря, скорость счета не должна влиять на его точность — играет роль только величина N . На практике это бывает не совсем так. При очень быстром счете электронные устройства могут не успевать регистрировать каждый импульс отдельно — «захлебываются». Два очень быстро следующих друг за другом импульса могут быть засчитаны за один. Реально такая опасность возникает при скорости счета, превышающей 100 000 имп./мин. Если приходится просчитывать радиоактивность на таком уровне, то следует вводить поправку, пользуясь соотношением:

$$N_{\text{ист}} = \frac{N}{1 - N\tau_{\text{сч}}/60}.$$

Здесь $N_{\text{ист}}$ — истинная величина счета радиоактивности, N — величина, регистрируемая счетчиком (обе — в имп./мин), а $\tau_{\text{сч}}$ — постоянная времени для данного счетчика, известная из его описания. Обычно она лежит в пределах 10^{-5} — 10^{-6} с.

Вводимая таким образом поправка может быть весьма заметной. Например, для $\tau_{\text{сч}} = 10^{-5}$ с и $N = 600\,000$ имп./мин подсчет по приведенной формуле дает $N_{\text{ист}} = 666\,000$ имп./мин. Если $\tau_{\text{сч}}$ неизвестно, то следует снизить уровень регистрируемой радиоактивности путем уменьшения количества подсчитываемого препарата. Для очень больших значений N , когда $N\tau_{\text{сч}} \geq 60$ приведенная формула теряет смысл, а счет невозможен.

Хемолюминесценция

Говоря о радиоактивных препаратах и сцинтилляторах, мы до сих пор не касались одного из серьезных источников ошибок в просчете радиоактивности — явления хемолюминесценции. Как явствует из самого названия, это свечение химического происхождения. Оно, как и всякое свечение, тоже связано с возбуждением электронов и последующим его высвечиванием, но энергию возбуждения в этом случае дает экзергоническая химическая реакция, которая протекает в препарате или сцинтилляторе. Фотоумножители регистрируют свечение хемолюминесценции и тем самым вносят ошибочную добавку к счету радиоактивности. Иногда эта «добавка» может измеряться тысячами импульсов в минуту и намного превышать счет истинной радиоактивности. Отсюда следует, что возможность возникновения хемолюминесценции никогда не следует упускать из виду. Нередко хемолюминесценцию удастся обнаружить по характерному для нее затуханию свечения во времени. Сначала это затухание идет быстро — его легко заметить по снижению числа импульсов в минуту при повторном просчете препарата через несколько минут. Затем наступает фаза медленного затухания люминесценции — в течение часов и даже дней. Здесь ее обнаружить труднее.

Присутствие в исходном препарате щелочи или «переваривание» биологического образца в щелочных «солюбилизаторах» (см. ниже) способствует возникновению хемолюминесценции. В случае использования в составе сцинтиллятора не очень хорошо очищенного толуола такая хемолюминесценция может быть продолжительной, поэтому перед внесением в жидкий сцинтиллятор препараты следует нейтрализовать уксусной, муравьиной или соляной кислотой (но не серной или хлорной!). Часто используемая для растворения гелей после электрофореза перекись водорода дает сильную хемолюминесценцию, которая, к счастью, исчезает при прогревании раствора в течение часа при 50° (при этом удаляются свободные радикалы). Во многих случаях таким образом удастся подавить хемолюминесценцию и других перекисей.

Энергетический спектр длительной хемолюминесценции близок к тритиевому. При счете ^{14}C ее можно подавить регулировкой нижнего порога усиления. В приборах последних марок осуществляются автоматический учет и вычитание счета хемолюминесценции. Эту операцию выполняет встроенный в прибор ком-

пьютер после определенного анализа характера поступающих импульсов. Возможность идентификации импульсов хеомлюминесценции базируется на своеобразии характера их совпадения при прохождении через схему совпадений. Хеомлюминесценция, будучи результатом единичного акта химического взаимодействия, является в принципе однофотонным процессом, в отличие от пролета β -частицы, когда возникает серия фотонов. Схема совпадений счетчика радиоактивности пропускает импульсы хеомлюминесценции только за счет множества почти одновременно происходящих, но все же *независимых* актов испускания света. Эта особенность хеомлюминесценции может быть обнаружена прибором.

Фотолюминесценция

Это свечение возникает в препарате или сцинтилляторе в результате поглощения энергии ультрафиолетового облучения. В отличие от хеомлюминесценции, оно может возникать повторно, при каждом новом облучении. Механизм фотолюминесценции сцинтилляционных систем не изучен, поэтому ограничимся рекомендацией избегать облучения препаратов ярким солнечным светом и указанием на целесообразность выдерживания флаконов перед просчетом в темноте. Сцинтилляторы следует хранить в темных бутылках. Даже пустые флаконы после яркого освещения фосфоресцируют: стеклянные — за счет следовых количеств редкоземельных элементов, а пластиковые, особенно нейлоновые, — за счет пластификаторов.

Флаконы для жидкостных счетчиков

Выбор типа флаконов немаловажен. Надо учитывать уровень фона, возникающего за счет флаконов, прозрачность и другие физические характеристики их материала, в частности эффект воздействия на него β -излучения от источника внешней стандартизации (см. ниже). Обычно флаконы изготавливают объемом в 20 мл и снабжают завинчивающимися пластиковыми крышками. В крышку изнутри иногда бывает вмонтирован полиэтиленовый конус, улучшающий стекание жидкости обратно во флакон после его встряхивания.

Флаконы изготавливают из обычного дешевого или боросиликатного (безкалиевого) стекла, из полиэтилена и нейлона. Последние два материала значительно дешевле, чем низкофоновое боросиликатное стекло, но проницаемы для растворителей: полиэтилен постепенно впитывает толуол, а нейлон — воду. Стеклянные флаконы склонны сорбировать липиды, белки, основные аминокислоты, некоторые катионы, поливалентные анионы и др. Сорбцию можно уменьшить силиконированием стекла или введением детергентов, например Тритона X-100, в состав сцинтиллятора. Иногда для насыщения центров сорбции на поверхности стекла флаконы предварительно споласкивают раствором нера-

диоактивного, склонного сорбироваться вещества или вводят такого же рода «холодные» носители в состав препарата.

В результате сорбции на стекле радиоактивных веществ с высокой энергией β -излучения за счет самопоглощения может происходить сдвиг их спектра в сторону меньших энергий. Это может повлечь за собой перераспределение счета в каналах при регистрации двойной метки (см. ниже) — сорбированный ^{32}P , например, может частично регистрироваться как ^{14}C .

Об увеличении фона за счет радиоактивных примесей ^{40}K в составе обычного стекла было сказано выше. Некоторые фирмы, наряду с обычными, предлагают более экономичные «мини-флаконы» уменьшенного объема. Эффективность счета в них, особенно для трития, несколько хуже, а для установки их в прибор нужны специальные адапторы. Мини-флаконы можно использовать для разделения счета ^{32}P и ^{14}C . Для этого мини-флакон с препаратом, но без сцинтиллятора помещают внутрь нормального флакона со сцинтиллятором. Только β -излучение ^{32}P в этом случае проникает через стенку мини-флакона и просчитывается. После этого сцинтиллятор заливают и внутрь мини-флакона. Теперь прибор будет регистрировать суммарную радиоактивность ^{32}P и ^{14}C .

ЧЕРЕНКОВСКОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ

Как известно, движение материальных объектов, в том числе элементарных частиц, со скоростью, большей скорости распространения света в пустоте ($c=300\,000$ км/с), невозможно. Однако в прозрачной среде свет распространяется с меньшей скоростью, чем в пустоте. Эта скорость равна c/n , где n — коэффициент преломления света в среде (для воды $n \approx 1,34$). Ввиду этого возможна ситуация, при которой β -частица, обладающая достаточной начальной энергией (>265 КэВ), будет пролетать через водную среду со скоростью, превышающей скорость света в этой среде, испуская бело-голубое свечение, предсказанное С. И. Вавиловым и впервые наблюдавшееся П. А. Черенковым. Оптический спектр этого свечения имеет монотонно снижающийся характер в интервале от 300 до 600 нм. В область спектральной чувствительности современных ФЭУ попадает около трети световой энергии черенковского излучения. Из сопоставления приведенного выше значения 265 КэВ с данными табл. 2 можно заключить, что из применяемых в биологии изотопов только ^{32}P и ^{131}I способны испускать β -частицы таких больших энергий, что их прохождение через водную среду может сопровождаться черенковским излучением. Это излучение можно регистрировать с помощью обычного сцинтилляционного счетчика. Надобность в сцинтилляторе при этом отпадает. Разбавленный водный раствор препарата, содержащего, например, радиоактивный фосфор, прямо заливают во флакон счетчика или просчитывают в пробирке, вставленной во флакон (иногда вместо этого употребляют специальные штативы для пробирок).

Одна β -частица ^{32}P , растрачивая на пути следования через растворитель свою энергию, успевает испустить в среднем 40 фотонов постепенно увеличивающейся длины волны, из которых 10—15 фотонов регистрируется фотоумножителями (если они распределяются между обоими ФЭУ — схема совпадений!). Слитный световой импульс, отмечающий испускание одной β -частицы, по своей интенсивности близок к средней интенсивности сцинтилляций при просчете радиоактивности трития. В соответствии с этим следует регулировать чувствительность счетчика излучения (устанавливать пороги усилителя).

Кроме чисто водной среды, черенковское излучение можно регистрировать и в других прозрачных жидкостях, например в растворах кислот. Тушение возможно и здесь, но только оптическое — за счет поглощения фотонов черенковского излучения на пути к ФЭУ окрашенными (особенно желто-красными) примесями. Просчитываемые по черенковскому излучению растворы препаратов имеет смысл обесцветить, например перекисью водорода, не забывая при этом о возможности возникновения хемолюминесценции (прогревать!). Окрашенный препарат можно поместить в тонкостенную полиэтиленовую пробирку, а ее центрировать во флаконе с водой. В этом случае быстрые β -частицы, проходя через стенки пробирки в воду, обладают еще достаточной энергией для возбуждения черенковского излучения без тушения. В английской литературе такой прием получил название «Cherenkov insert». В случае необходимости поправку на оптическое тушение можно вводить по методу «отношения каналов», как описано ниже.

Необходимо подчеркнуть важность строго центрального расположения препарата при регистрации черенковского излучения, особенно если объем этого препарата мал. Как уже отмечалось, в процессе регистрации здесь участвует 10—15 фотонов. Черенковское излучение имеет направленный характер — под определенным углом к траектории полета β -частицы. При неудачном расположении препарата фотоны, испускаемые некоторыми β -частицами, будут попадать только в один из двух ФЭУ и соответствующие импульсы не смогут пройти через схему совпадений. Иногда полистироловую пробирку с препаратом центрируют в специально сконструированной крышке обычного флакона.

Эффективность счета черенковского излучения в силу тех же причин существенно зависит от объема препарата. Для счета ^{32}P оптимальный объем воды лежит в интервале 10—15 мл. Для ^{131}I зависимость от объема более «острая» — оптимум лежит вблизи 10 мл. Оптимальные объем и расположение образца для счета черенковского излучения следует подбирать и обязательно воспроизводить при сопоставлении счета нескольких препаратов.

Даже в наилучших условиях эффективность счета черенковского излучения для ^{32}P обычно не превышает 25—30%. Для ее увеличения можно использовать добавки, сдвигающие весь спектр излучения в более длинноволновую область. В качестве

такой добавки (англ. «shifter») используют, например, 2-нафтиламин-6,8-дисульфокислоту (в концентрации 100 мг/мл). Есть сведения, что при этом эффективность счета черенковского излучения ^{32}P удастся увеличить до 50%.

γ-СЧЕТЧИКИ С ТВЕРДЫМ СЦИНТИЛЛЯТОРОМ

Препараты для счета γ-излучения либо вносят в специальные стаканчики прибора, либо просчитывают в пробирках любого размера, помещающихся в этих стаканчиках. γ-Излучение легко проходит через стенки пробирки и стаканчика. Стаканчик опускают в колодец, высверленный в центре кристалла твердого сцинтиллятора, диаметром в 2 или 3 дюйма. К кристаллу примыкают фотокатоды ФЭУ. Из-за высокой энергии излучения в γ-счетчиках не используют схему совпадений — тепловые «шумы» ФЭУ отсекаются установлением высокого нижнего порога усиления. Зато для более полного улавливания квантов света, выходящих во все стороны из кристалла сцинтиллятора, имеет смысл установить два или три независимо работающих ФЭУ. Импульсы, регистрируемые каждым из них, поступают на вход одного усилителя; таким образом, число их суммируется.

Иногда, в зависимости от уровня жидкости в пробирке, глубина опускания стаканчика в кристалл может регулироваться. Мощная свинцовая защита препятствует попаданию в кристалл γ-излучения от препаратов, ожидающих просчета в автоматических счетчиках, куда загружается несколько сот образцов. Система регистрации импульсов сцинтилляции, порождаемых вторичными электронами (фотоэлектронами и комптоновскими), такая же, как в счетчиках β-излучения. Регулируемые нижний и верхний пороги позволяют «вырезать» определенный участок спектра амплитуд, например область одного из фотоэлектронов (см. рис. 50). Для удобства работы с γ-излучениями разных энергий часто предусматриваются переключатели диапазонов усиления, например для регистрации излучений с энергиями до 500, 1000 или 2000 КэВ. Современные счетчики имеют два канала усиления для одновременного счета двух γ-излучений. Регулированием высоты порогов усиления можно обеспечить счет импульсов от каждого из γ-излучателей, например ^{125}I и ^{131}I , в разных каналах.

Эффективность счета γ-излучения составляет обычно 70—75%. Потери в счете, как уже упоминалось, обусловлены «непродуктивным» прохождением части γ-квантов через всю толщину кристалла и вдоль оси колодца. γ-Счетчики последних моделей фирмы «Beckman» автоматически определяют эффективность счета и печатают истинные значения радиоактивности, выраженные числом распадов в минуту.

РЕГУЛИРОВАНИЕ (НАСТРОЙКА) ЖИДКОСТНОГО СЦИНТИЛЛЯЦИОННОГО СЧЕТЧИКА

В таком счетчике имеется обычно два или три канала для одновременного счета радиоактивности двух (реже трех) изотопов в одном препарате. Каждый из этих «рабочих» каналов может настраиваться экспериментатором независимо от остальных. Кроме этого, в современных приборах имеется еще два канала «стандартизации», настройка которых фиксирована на заводе. Назначение этих каналов будет ясно из дальнейшего.

Термином «канал» обозначают электрическую цепь, в которую обязательно входят устройства для регулирования порогов и для счета импульсов. У счетчиков с линейными усилителями (фирм «Pascard», «Nuclear-Chicago») последние тоже входят в цепочки каналов, а степень создаваемого ими усиления регулируется независимо в каждом из них. Такое расположение усилителей позволяет сортировать импульсы излучения малых и больших энергий (с помощью порогов) в наиболее выгодных условиях. Например, усиление в канале, предназначенном для регистрации ^3H , можно сделать большим (50% от максимального), а в канале, настраиваемом на регистрацию ^{14}C , — малым (7% от максимального). Тогда амплитуды импульсов, отбираемых пороговыми устройствами и поступающих далее на счетчики, будут иметь один и тот же порядок величины в обоих каналах. Схема совпадений всегда стоит до разветвления регистрируемых импульсов по каналам. Она сразу же (или после предварительного небольшого усиления) отсеивает шумовые импульсы, генерируемые фотоумножителями.

В счетчиках с логарифмическими усилителями (фирм «Beckman», «Intertechnique») благодаря сближению максимальных амплитуд импульсов («сжатию» спектров амплитуд — см. выше) пользуются одним усилителем, стоящим сразу после схемы совпадений. Регулировка усиления осуществляется на заводе. Импульсы напряжения с выходных клемм этого усилителя одновременно подаются на вход всех каналов, и далее в каждом канале происходит их сортировка по амплитудам с помощью пороговых устройств.

Рассмотрим более подробно различные случаи регулировки счетчиков такого типа на примере счетчика «Intertechnique SL-3000». На рис. 60 условно изображены основные элементы электрической схемы сцинтилляционного счетчика с двумя каналами регистрации импульсов. Из этой упрощенной схемы видно, каким путем импульсы с двух ФЭУ подаются на схему совпадений, прошедшие через нее импульсы поступают в усилитель, а с его выходных клемм двумя параллельными путями проходят по каналам А и В.

Во всех случаях регулировки надо располагать «стандартами радиоактивности» для каждого из изотопов. Эти стандарты представляют собой герметически запечатанные флаконы, где в из-

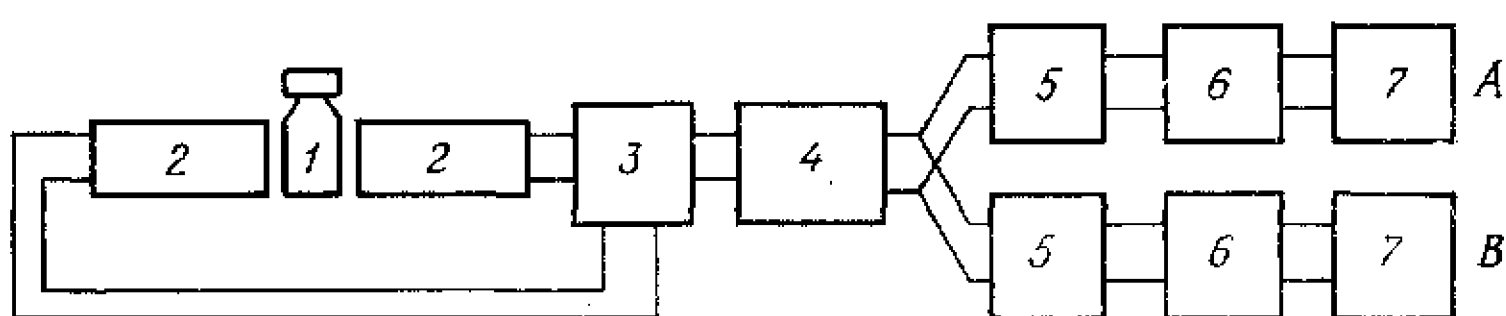


Рис. 60. Принципиальная электрическая схема сцинтилляционного счетчика с двумя каналами

1 — флакон с препаратом; 2 — ФЭУ; 3 — схема совпадений; 4 — логарифмический усилитель; 5 — нижний порог; 6 — верхний порог; 7 — счетчик числа импульсов; А — первый канал; В — второй канал

вестном сцинтилляторе находится определенное количество изотопа с точно известной (расп./мин) радиоактивностью, без тушения. Стандарты поставляются фирмами-изготовителями счетчиков. Желательно, чтобы рабочий сцинтиллятор был таким же, как в стандарте. Если сцинтилляторы сильно отличаются друг от друга, можно приготовить собственный лабораторный стандарт, воспользовавшись для этой цели точно отмеренной радиоактивностью (по заводским данным и разбавлению) вещества, не вносящего тушителей. Для толуоловых сцинтилляторов в качестве таких веществ хорошо использовать ^3H -холестерин и ^{14}C -октадекан. Радиоактивность в стандарте должна быть меньше 100 000 расп./мин (см. раздел «Точность счета»).

Настройка одного канала для счета одного изотопа

Цель настройки — добиться максимальной эффективности счета для данного изотопа при минимуме фона. Средство настройки — выбор значений нижнего (НП) и верхнего (ВП) порогов. Этот выбор практически осуществляется установкой положений двух соответствующих рукояток («верньеров»), выведенных на панель прибора (рис. 61). На диске каждого из верньеров имеется 50 делений (10 секторов по 5 делений); кроме того, верньеры могут совершать 10 полных оборотов, отмеченных сменной цифры в окошечке диска. Таким образом, имеется 500 положений установки верньера. Каждому положению отвечает определенное значение порога, т. е. значение напряжения, ограничивающее «снизу» или «сверху» возможность прохождения импульса в зависимости от его амплитуды. Сами эти напряжения не указываются, но существенно, что оба верньера откалиброваны по амплитудам импульсов совершенно одинаково.

Здесь уместно отметить, что некоторые фирмы в своих последних моделях счетчиков с компьютерами и микропроцессорами все описываемые ниже операции настройки прибора поручают автоматике. Существо дела от этого не изменяется. Используя автоматические устройства, следует иметь представление о прин-

дипе их работы, без чего невозможно обнаружить могущие возникнуть нарушения нормального функционирования автоматики. После этого замечания вернемся к описанию процессов настройки счетчиков вручную.

Для понимания смысла описываемых ниже манипуляций рассмотрим снова рис. 59. Из него следует, что в данном простом

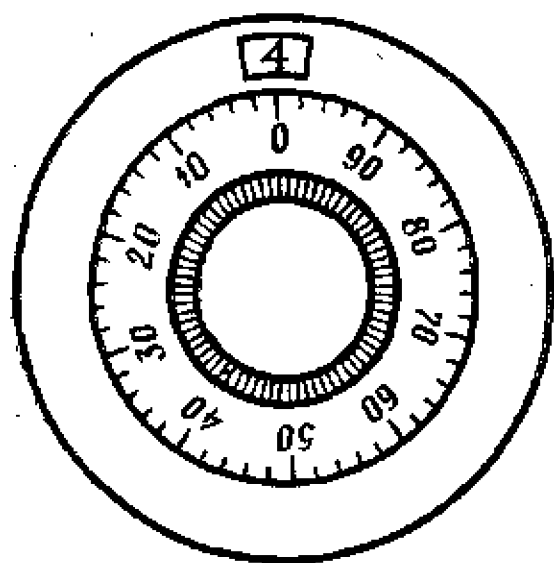


Рис. 61. Верньер установки порога амплитуды импульсов

случае задача настройки канала сводится к такому выбору положения порогов, когда почти весь спектр амплитуд полезных импульсов будет беспрепятственно проходить между порогами, а импульсы фона окажутся максимально «обрезанными». Слово «почти» здесь относится к положению НП. Из рис. 59 видно, что его имеет смысл несколько сдвинуть («поднять») от нулевого положения.

Небольшим числом полезных импульсов малой амплитуды при этом мы пожертвуем, но это окупится более существенным уменьшением фона в этой же области. Единственным индикатором результатов наших манипуляций с порогами служит скорость счета. Однако, если держать в памяти рис. 59, то трактовка изменений этой скорости не представит затруднений.

Итак, начнем с того, что установим в прибор «стандарт» для данного изотопа. ВП поднимем максимально (на рис. 59—отодвинем вправо), убрав таким образом ограничение амплитуд импульсов «сверху». Практически это означает, что верньер верхнего порога мы должны вращать по часовой стрелке до отказа. Затем начнем постепенно поднимать НП, наблюдая за уменьшением скорости счета. Эту операцию будем продолжать до тех пор, пока не заметим резкого падения скорости счета почти до нуля. Из рис. 59 ясно, что весь спектр амплитуд импульсов стандарта теперь оказался ниже уровня НП — мы достигли «правой» границы этого спектра, т. е. как раз того положения, в которое надо будет установить ВП. Запишем это положение (номер деления на верньере НП). Затем вернем НП в нулевое положение и будем опускать ВП до тех пор, пока скорость счета окажется очень малой. Теперь почти весь спектр амплитуд импульсов стандарта лежит выше ВП, а это как раз то положение, в которое надо установить НП. Запишем и его. Остается установить НП и ВП в найденные для них положения (напомним, что оба верньера откалиброваны одинаково), и регулировка канала закончена. Можно просчитать радиоактивность в импульсах в минуту (N). Истинная радиоактивность стандарта в распадах в минуту (D) известна. Их отношение определяет эффективность счета (E) данного изотопа в данном сцинтилляторе при выбранной настройке канала: $E = N/D$.

Этой величиной можно будет воспользоваться для вычисления истинной радиоактивности рабочего препарата, просчитанной в том же самом сцинтилляторе при точно такой же настройке канала: $D=N/E$.

Величина E здесь выражена, разумеется, не в процентах, а в долях единицы. В счетчике предусмотрена возможность переключения канала на заранее выполненную (на заводе) настройку для регистрации одного из распространенных изотопов (^3H , ^{14}C , ^{32}P). Однако надо помнить, что сцинтиллятор, использованный при заводской настройке, мог быть иным, чем в данном опыте, а от выбора сцинтиллятора эффективность счета зависит довольно существенно.

Настройка двух каналов для счета двух разных изотопов

Пусть в состав исследуемого препарата входят вещества, помеченные тритием и радиоактивным углеродом. Для их выявления необходимо отдельно просчитать радиоактивность ^3H и ^{14}C . Значит, потребуется два канала. Условимся, что канал A настраивают на счет ^3H , а канал B — на счет ^{14}C .

Сначала представим себе всю ситуацию с помощью спектра распределения амплитуд импульсов. Через усилитель проходят и на вход обоих каналов подаются как импульсы, обязанные своим происхождением распаду трития, так и импульсы углерода. На рис. 62 показано наложение спектров тех и других импульсов. Легко видеть, что в области больших амплитуд (в правой части спектра) проходят только импульсы ^{14}C , зато в левой части графика смешиваются импульсы от ^3H и импульсы относительно малой амплитуды из спектра ^{14}C . Сам счетчик не может различить их, поэтому приходится проделать некоторые вспомогательные операции, чтобы получить возможность расчетным путем оценить вклад каждого изотопа. Для этого потребуются стандарты обоих изотопов. Начинают с более простой операции — настраивают канал B так, чтобы через него проходили только импульсы ^{14}C , даже если придется примириться с неоптимальной эффективностью их счета. На рис. 62 указано положение порогов, отмеченных индексом соответствующего канала. Положение НП_B выбрано так, что он преграждает доступ в канал B всем импульсам ^3H . Практически это положение находят следующим образом. Устанавливают в прибор стандарт ^3H и поднимают (как было описано выше) нижний порог канала B («углеродного») до тех пор, пока счет в этом канале не прекратится. Оптимальное положение ВП_B находят точно так же, как при счете одного изотопа — с помощью стандарта ^{14}C .

Затем настраивают канал A . В него неизбежно будут проникать импульсы от ^{14}C . Их число ограничивают так, чтобы оно не превышало 10% от полного числа импульсов ^{14}C . Для этого устанавливают в прибор стандарт ^{14}C и максимально раздвигают

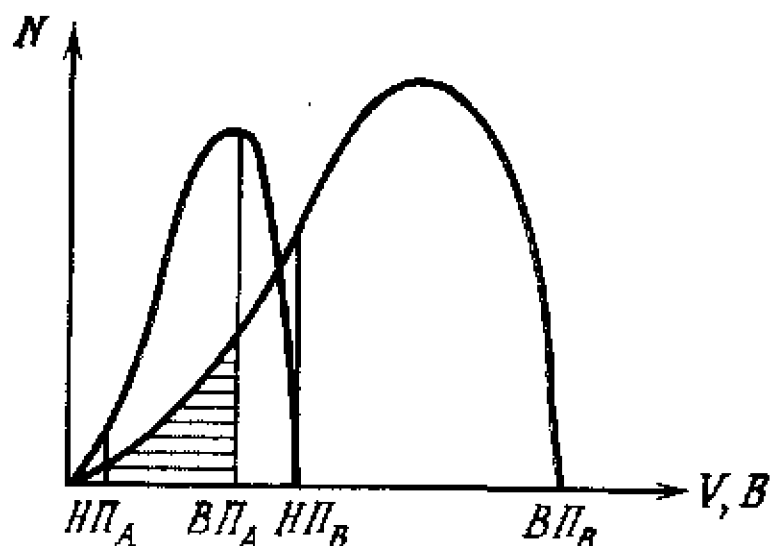


Рис. 62. Наложение спектров амплитуд импульсов ^3H и ^{14}C (установка порогов для счета двойной метки)

пороги канала A . Это позволит определить полное число импульсов ^{14}C . Затем снижают порог ВП_A до тех пор, пока счет ^{14}C в канале A («третиевом») не снизится до 10% от

максимального. Положение НП_A устанавливают так же, как при счете одного изотопа — с помощью стандарта ^3H . На этом регулировку каналов заканчивают.

Теперь определяют три значения эффективности счета. Во-первых, по стандарту ^3H определяют эффективность счета трития в канале A : $E_{т,А} = N_{т,А} / D_t$. Здесь $N_{т,А}$ — счет стандарта ^3H , регистрируемый в канале A ; D_t — истинная радиоактивность стандарта ^3H . Во-вторых, точно так же, по стандарту ^{14}C , вычисляют эффективность счета углерода в канале B : $E_{у,В} = N_{у,В} / D_y$. Однако около 10% импульсов углерода просчитываются в канале A , поэтому следует подсчитать эффективность и этого счета. В прибор устанавливают стандарт ^{14}C , а счет смотрят в канале A (не меняя положения порогов!). Используя аналогичные обозначения, расчет производят так: $E_{у,А} = N_{у,А} / D_y$. Значение $E_{у,А}$ будет заведомо меньше 0,1.

Теперь можно приступить к регистрации двойной метки в препарате и соответствующим расчетам. Не меняя настройки каналов, устанавливают в прибор флакон с препаратом и регистрируют (за вычетом фона) счет в обоих каналах: N_A и N_B . Индексы «т» и «у» здесь не фигурируют, так как по крайней мере в канале A заведомо просчитываются импульсы от обоих изотопов. С помощью найденных значений эффективностей счета выявляют истинное распределение радиоактивностей.

Содержащуюся в препарате полную радиоактивность ^{14}C легко определить по уровню счета в канале B , где, как мы знаем, считается только углерод: $D_y = N_B / E_{у,В}$. Разумеется, здесь символ D_y обозначает истинную радиоактивность не стандарта, а препарата (не стоит усложнять обозначения для их различения — это легко сделать по смыслу изложения). Зная D_y в препарате, можно подсчитать вклад углерода в суммарный счет, зарегистрированный в канале A : $N_{у,А} = D_y E_{у,А}$. На долю трития приходится остальная часть счета в канале A : $N_{т,А} = N_A - N_{у,А}$.

Наконец, истинная радиоактивность трития в препарате может быть подсчитана с помощью найденной выше эффективности его счета в канале A : $D_t = N_{т,А} / E_{т,А}$.

В современном счетчике предусмотрены заводские настройки двух каналов для счета разных пар изотопов ($^3\text{H}/^{14}\text{C}$, $^3\text{H}/^{32}\text{P}$ и $^{14}\text{C}/^{32}\text{P}$), выполненные с использованием определенного фирмен-

ного сцинтиллятора. Счетчик, снабженный компьютером и микропроцессором, выполняет все операции настройки и расчетов автоматически, если ему «сообщить» значения радиоактивностей стандартов, а сами стандарты поочередно установить в прибор.

Учет тушения при счете одного изотопа

Помимо всех прочих потерь счета, необходимо учесть и потери, обусловленные описанным выше тушением сцинтилляций. Рассмотрим три способа решения этой задачи.

Метод внутренней стандартизации. Этим методом можно воспользоваться при счете радиоактивности в простейшем одноканальном счетчике. В принципе он очень прост. Просчитывают рабочий препарат и записывают результат счета. Обозначим его N_n . Затем в тот же самый флакон с препаратом вносят точно известную радиоактивность стандарта — D_c . Снова просчитывают число импульсов в минуту, на этот раз суммарное N_z , и вычитанием определяют приращение счета, обусловленное внесенной радиоактивностью: $N_c = N_z - N_n$. Так как импульсы радиоактивности препарата и стандарта просчитываются независимо друг от друга, эффективность счета (с учетом тушения) можно подсчитать для импульсов стандарта: $E = N_c / D_c$. С точно такой же эффективностью просчитана и радиоактивность препарата, поэтому ее истинное значение можно найти из соотношения: $D_n = N_n / E$.

Несмотря на свою простоту, метод этот трудоемок, требует очень точной дозировки вносимого стандарта и исключает возможность повторного просчета радиоактивности препарата. Если тушение изменяется от препарата к препарату, то описанную операцию надо повторять для каждого флакона.

Метод отношения каналов. В этом случае необходим счетчик с двумя каналами. Оба канала используют для счета одного и того же изотопа, но своеобразная настройка этих каналов позволяет выявить и оценить эффект тушения. При этом используют отмеченное выше явление сдвига спектра амплитуд при наличии тушения (см. рис. 49). Чем оно сильнее, тем больше сдвигается спектр (рис. 63).

Метод требует набора стандартов данного изотопа с разной степенью тушения для выбранного сцинтиллятора. В качестве тушителя может быть использовано любое подходящее вещество, не обязательно то же самое, которое обуславливает тушение в рабочем препарате. Впрочем, желательно все-таки имитировать природу тушения. В качестве тушителя химической природы можно взять, например, четыреххлористый углерод, а в качестве органического — азобензол. Наборы стандартов с тушением (6—8 флаконов) имеются в продаже, но в этом случае опять возникает вопрос об идентичности сцинтилляторов. Для приготовления такого набора в условиях лаборатории поступают следующим образом. В 15—20 флаконов с одинаковыми объемами сцинтилля-

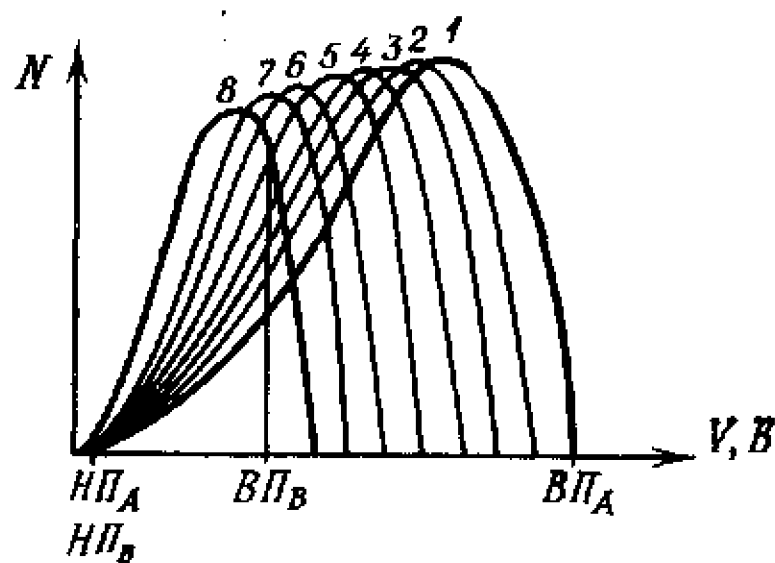


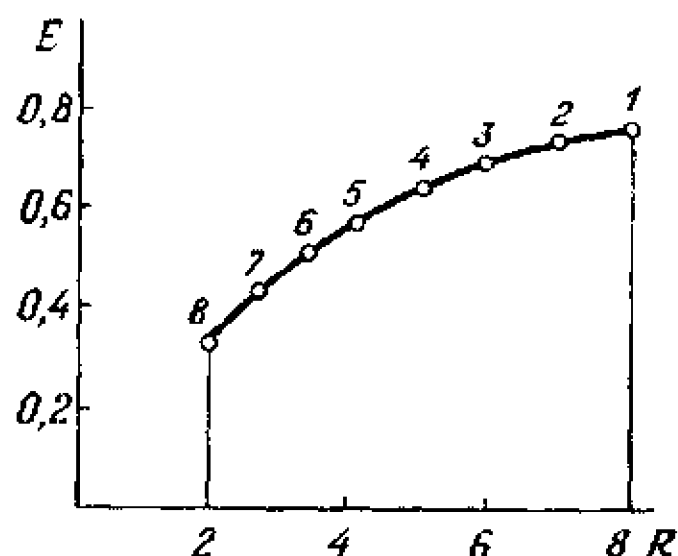
Рис. 63. Изменение спектра амплитуд импульсов по мере увеличения степени тушения (установка порогов для коррекции тушения по методу отношения каналов)

Номера 1—8 на кривых соответствуют номерам флаконов с возрастающим содержанием тушителя (см. текст)

тора вносят по возможности одинаковую радиоактивность без тушителя — примерно 100 000 расп./мин в каждый флакон. Потом все их просчитывают и отбирают восемь наиболее близких по уровню счета, для которых должно иметь место соотношение $(2\sqrt{N/N_{\text{ср}}}) \times 100 < 0,2$, где N — счет в данном флаконе, $N_{\text{ср}}$ — среднее значение счета по отобранным восьми флаконам. Далее во все флаконы, начиная со второго, вносят постепенно возрастающее количество тушителя (10%-ного раствора CCl_4 или 0,1%-ного раствора азобензола в сцинтилляторе). Объемы жидкости во всех флаконах уравнивают добавлением чистого сцинтиллятора.

Пусть рабочим каналом счета препарата будет канал А. Его настраивают на максимальный счет по флакону № 1 (без тушителя), как было описано выше — положение порогов канала А на рис. 63 можно сопоставить с их положением на рис. 59. Для настройки канала В в прибор устанавливают флакон № 8 с наибольшим содержанием тушителя. Уменьшенный по сравнению с флаконом № 1, но все же максимальный уровень счета радиоактивности в этом флаконе можно зарегистрировать в канале А. Положение верхнего порога канала В выбирают таким образом, чтобы счет радиоактивности флакона № 8 в этом канале составил 60—70% от максимального (см. рис. 63). Нижний порог ($\text{НП}_В$) устанавливают как обычно — настройка закончена. Теперь просчитывают каждый из восьми флаконов и записывают соответствующие значения счета в обоих каналах — N_A и N_B . Вычисляют для каждого флакона эффективность счета в канале А: $E = N_A/D$. Здесь символ D обозначает истинную радиоактивность, одинаковую во всех флаконах. Величина E , очевидно, должна плавно уменьшаться от флакона № 1 к флакону № 8 за счет увеличения тушения. Затем для каждого из флаконов подсчитывают отношение (R) уровней счета в каналах А и В: $R = N_A/N_B$. Это отношение, оставаясь бóльшим единицы, тоже будет уменьшаться от флакона № 1 к флакону № 8. Причина состоит в том, что несмотря на тушение счет в канале В будет плавно возрастать благодаря сдвигу спектра амплитуд (см. рис. 63). Если для флакона № 8 установка $\text{ВП}_В$ позволяла зарегистрировать 60—70% от максимального счета (т. е. от полного его спектра), то при просчете флакона № 1 в канал В попадет лишь неболь-

Рис. 64. Кривая коррекции тушения по методу отношения каналов
 E — эффективность счета; R — отношение счета в каналах A и B ; 1—8 — номера флаконов с возрастающим содержанием тушителя



шая доля импульсов, образующих спектр амплитуд для этого флакона.

Подсчитанные указанным образом значения можно отложить на графике (рис. 64). Соединив точки графика плавной линией, получают так называемую «кривую коррекции тушения» по методу «отношения каналов». Суть дела заключается в том, что функция $E=f(R)$ хотя и нелинейна, но однозначна и одинакова для любого тушителя, так как изменения обеих величин (E и R) обусловлены одним и тем же физическим явлением — снижением эффективности генерирования световых импульсов пролетающей через сцинтиллятор β -частицей из-за присутствия в нем молекул тушителя. Заметим, что график нельзя экстраполировать за граничные точки 1 и 8.

Теперь можно просчитать рабочий препарат, обнаружить в нем присутствие тушителей и оценить эффективность счета. Не изменяя настройки, просчитывают препарат одновременно в каналах A и B . Точно так же, как и ранее, вычисляют значение «отношения каналов» R . Из графика по известному R определяют E — эффективность счета в канале A . Наконец, опираясь на уровень счета в канале A , подсчитывают истинную радиоактивность препарата: $D=N_A/E$. О степени тушения, очевидно, можно судить по значению R для данного препарата.

Вообще говоря, описанные операции можно провести и на простом одноканальном счетчике, перестраивая канал каждый раз по мере необходимости с «варианта A » на «вариант B » и обратно.

Метод отношения каналов в принципе можно использовать и для оценки эффективности счета радиоактивности на фильтрах (см. ниже), где снижение счета из-за самопоглощения излучения в слое осадка сопровождается сдвигом спектра амплитуд импульсов. Моделировать «тушение» при построении градуировочной кривой здесь можно изменением объема осадка путем добавления к известной радиоактивности разных количеств «балластного» осаждающегося материала. Однако точность коррекции самопоглощения в осадке получается невысокой ввиду большей сложности и плохой воспроизводимости этого явления.

Метод «внешнего стандарта». В этом случае для определения и коррекции тушения вводят два дополнительных канала (обоз-

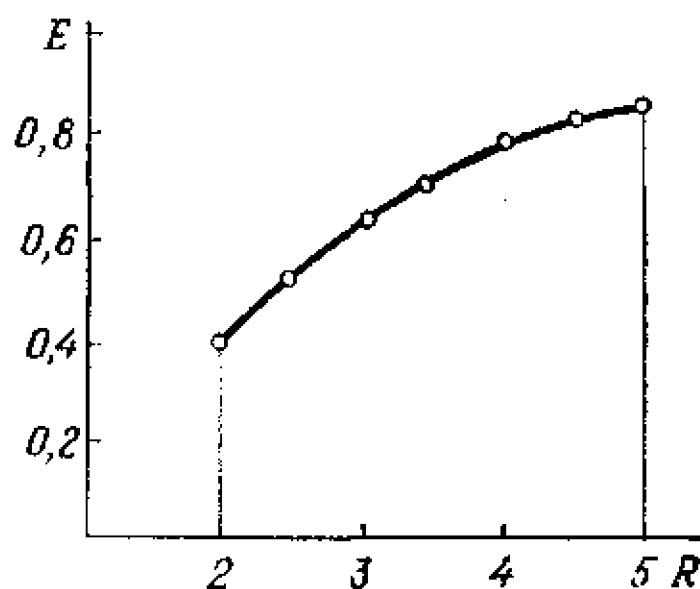
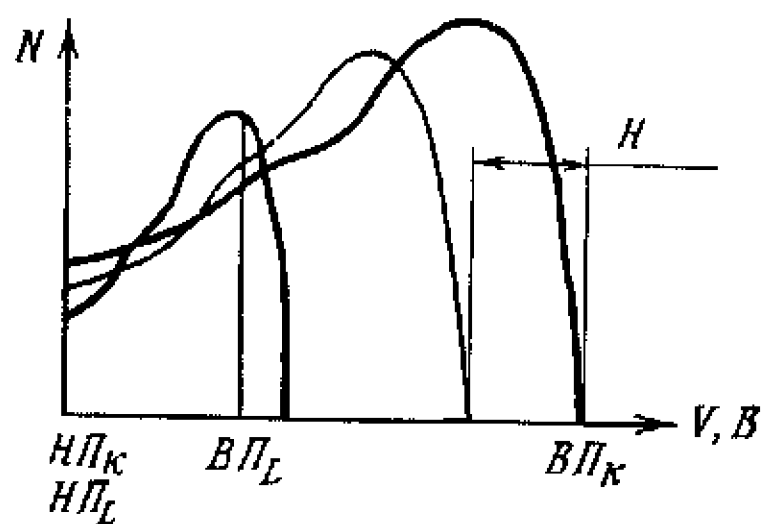


Рис. 65. Сдвиг спектра амплитуд комптоновских электронов, порождаемых γ -облучением от внешнего стандарта, при наличии тушения

НП и ВП — положения порогов во вспомогательных каналах K и L при коррекции тушения методом внешнего стандарта; H — сдвиг границы максимальных амплитуд за счет тушения

Рис. 66. Кривая внешней стандартизации (кривая тушения)

E — эффективность счета; R — отношение внешнего стандарта

начим их K и L), отрегулированные на заводе. Ни их пороги, ни счетчики не выведены наружу. Заметим, что механизм тушения не зависит от природы изотопа. Процесс тушения, как и сцинтилляции, начинается с возбуждения молекул растворителя, например толуола, а энергия этого возбуждения неизменна. Поэтому в прибор можно ввести свой собственный источник радиоактивности. Чтобы не вносить его внутрь рабочих флаконов, пользуются источником сильного γ -излучения, например радиоактивным цезием или радием. Этот неизменный источник и называют «внешним стандартом».

Механическое устройство может извлекать внешний стандарт из его надежного свинцового укрытия и подносить к флакону, когда он опущен в рабочее положение между двумя ФЭУ. Проникающее внутрь флакона γ -излучение вызывает появление в сцинтилляторе комптоновских электронов (см. выше). Каждый из них порождает импульс сцинтилляций, который регистрируется точно так же, как импульс обычной β -частицы. Спектры амплитуд этих импульсов похожи друг на друга. При наличии тушения счет комптоновских электронов уменьшается, а спектр их амплитуд сдвигается «влево» точно так же, как было описано для β -частиц (рис. 65).

Каналы K и L на заводе настраивают так же, как каналы A и B в методе отношения каналов. Если в прибор один за другим устанавливать флаконы стандартного набора с одинаковой радиоактивностью, но различной степенью тушения, то в силу тех же, рассмотренных выше причин отношение счета в каналах K и L ($R = N_K/N_L$) будет уменьшаться по мере усиления тушения. В этом методе величину R называют «отношением внешнего стандарта». Прибор сам подсчитывает его значения и печатает их на ленте. Отметим, что для определения R в наборе стандарт-

ных флаконов используется только изменение степени тушения, а находящийся в них радиоактивный материал является лишним. Прибор предварительно подсчитывает его радиоактивность в обоих каналах для каждого флакона до поднесения к нему γ -излучателя, а затем, при подсчете значений N_K и N_L значения этих «внутренних радиоактивностей» вычитаются. То же самое происходит и при просчете рабочего препарата. Таким образом, отношение R определяется только по радиоактивности внешнего стандарта и зависит только от степени тушения в сцинтилляторе.

«Внутренняя», точно известная радиоактивность вполне определенного изотопа должна находиться во флаконах набора стандартов с тушением для того, чтобы одновременно с подсчетом R (каналы K и L) в любом из рабочих каналов A , B и C можно было подсчитывать и значения эффективности счета (E) для каждого из флаконов. Заметим, что эффективность можно определять при любом выборе положений порогов в этих каналах. Между величинами E и R опять существует однозначная зависимость, которую можно представить графически (рис. 66). Ее называют «кривой внешней стандартизации», или «кривой тушения». Каждому выбору положения порогов в рабочем канале отвечает своя кривая тушения. Просчитывая в том же сцинтилляторе и при неизменной регулировке порогов рабочий препарат, по значению R , которое «сообщает» прибор, можно из кривой тушения найти эффективность счета и определить по ней истинную радиоактивность препарата, как было описано для метода отношения каналов.

Здесь надо сделать несколько предостерегающих замечаний. Во-первых, метод внешнего стандарта пригоден только для растворенных препаратов. Тушение может быть обусловлено и веществами, поступившими с препаратом, но они должны перейти в раствор сцинтиллятора, так как все явления, следующие за γ -облучением, разыгрываются исключительно в этом растворе. Учитывать самопоглощение излучения в осадках и на фильтрах методом внешнего стандарта нельзя. Можно уточнить, что, кроме истинных растворов, рассматриваемый метод пригоден и для «псевдорастворов» — тонких эмульсий, например системы толуол—Тритон X-100—вода, однако лишь до определенного содержания в ней воды. Подробнее об этом сказано ниже. Точно такая же эмульсия при этом должна быть и в наборе стандартов тушения.

Во-вторых, объем сцинтиллятора в рабочих препаратах должен быть таким же, как в наборе стандартов. Вспомним, что эффективность регистрации γ -излучения зависит от объема сцинтиллятора. Просчет препаратов в меньших объемах сцинтиллятора, чем использовались при построении кривой тушения, дает завышенные значения радиоактивности. Наконец, при внешней стандартизации не рекомендуется использовать пластиковые флаконы ввиду постепенной диффузии толуола в материал стенок

флакона, где под действием γ -облучения растворитель будет сцинтиллировать и при пустом флаконе.

В новых счетчиках фирмы «Вескман» вместо отношения внешнего стандарта R используется другой параметр, также однозначно связанный с явлением тушения, — величина сдвига спектра амплитуд комптоновских электронов. На рис. 66 она обозначена « H ». Кривая эффективности счета строится в координатах E и H . Таким образом, можно обойтись одним дополнительным каналом стандартизации. Принцип метода учета тушения по существу своему остается тем же — использование корреляции изменения эффективности счета и сдвига спектра амплитуд в результате тушения.

Учет тушения при счете двойной метки

Настройку каналов A и B для регистрации двойной метки производят по стандартам радиоактивности без тушения точно так же, как описано выше и показано на рис. 62. Однако в этом случае нельзя пользоваться при расчете тремя эффективностями счета $E_{т,А}$, $E_{у,В}$ и $E_{у,А}$, вычисленными для этой настройки по стандартам без тушения.

Вместо этого надо воспользоваться двумя наборами стандартов радиоактивности (^3H и ^{14}C) с различной степенью тушения. Не изменяя настройки каналов, следует подсчитать значения трех упомянутых эффективностей счета для каждого из флаконов обоих наборов, регистрируя каждый раз отношения внешнего стандарта, и построить три кривых тушения для трех эффективностей (рис. 67). Каждой степени тушения отвечают одно значение отношения внешнего стандарта R и три значения эффективности счета: трития в канале A и углерода в каналах B и A . Заметим, что, в отличие от двух других, эффективность счета углерода в канале B ($E_{у,В}$) с увеличением степени тушения ($R_{\text{max}} \rightarrow R_{\text{min}}$) возрастает. Это — результат сдвига спектра в сторону меньших амплитуд: все бо́льшая часть импульсов углерода попадает в канал трития. Это видно из рис. 68, где пунктиром показаны спектры амплитуд ^3H и ^{14}C без тушения, а жирной линией — те же спектры при наличии тушения. При неизменной регулировке порогов легко видеть, как увеличивается доля импульсов спектра углерода, амплитуда которых оказывается ниже (на рисунке — левее) ВП_A . При сильном тушении и неудачном выборе порогов вся радиоактивность ^{14}C может оказаться в канале A и возникнет ложное представление о том, что меченный по углероду компонент в составе препарата отсутствует.

При просчете рабочего препарата (те же сцинтиллятор и настройка каналов!) прибор печатает значения счета в каждом канале (N_A и N_B), а также отношение внешнего стандарта R , определяемое автоматически для этого препарата. По нему из трех кривых тушения можно найти значения трех эффективностей и далее провести точно такие же расчеты истинных радиоактивно-

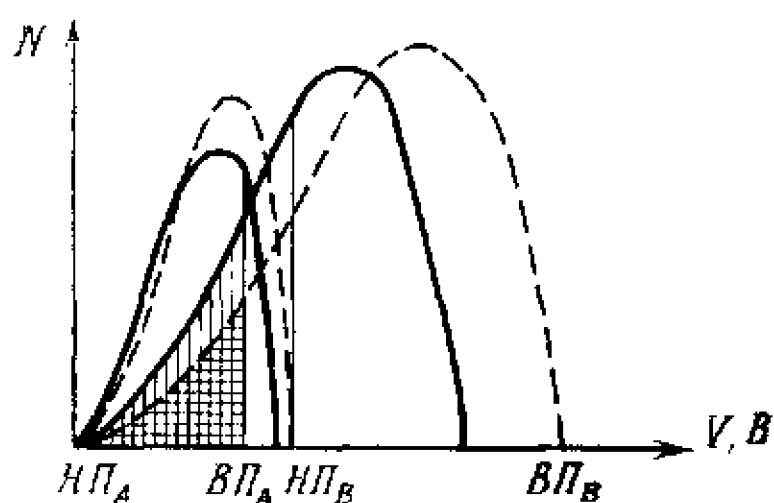
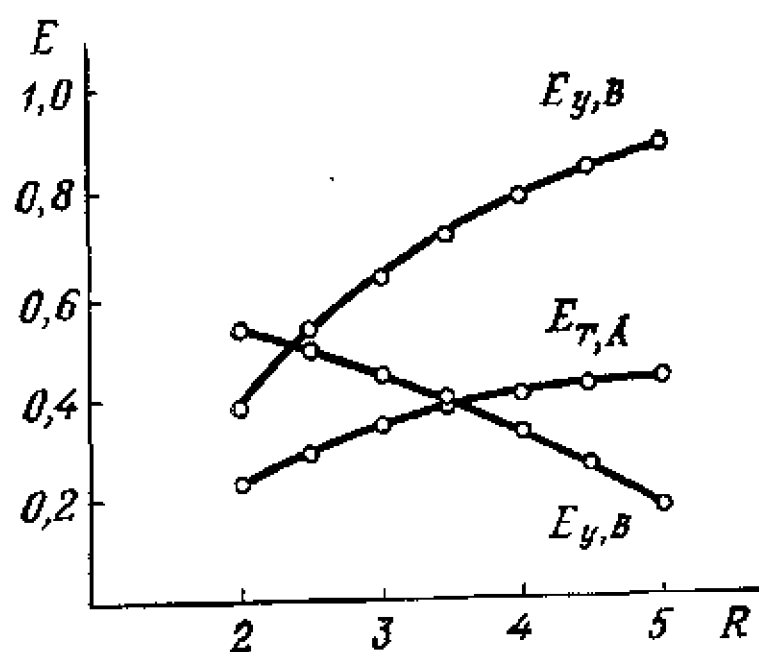


Рис. 67. Кривые тушения при счете двойной метки (см. текст)

Рис. 68. Сдвиг спектров амплитуд в результате тушения при счете двойной метки (увеличение вклада ^{14}C в счет, регистрируемый в канале ^3H ; см. текст)

стей обоих изотопов, какие были описаны выше для счета двойной метки без тушения.

При просчете большой серии препаратов с заранее неизвестной степенью тушения все эти вычисления становятся утомительными и трудоемкими, поэтому естественно поручить их небольшому компьютеру. Таким устройством оснащаются все современные счетчики. Чтобы компьютер мог подсчитывать все эффективности и истинную радиоактивность каждого препарата, в него надо ввести экспериментальную кривую внешней стандартизации или три кривых в случае счета двойной метки. Сообщить компьютеру вид любой плавной зависимости $E=f(R)$ можно, найдя хорошее приближение к этой зависимости в виде кубического уравнения: $E=aR^3+bR^2+cR+d$. Коэффициенты a , b , c и d можно подобрать так, что график будет практически неотличим от полученной в эксперименте кривой тушения в пределах крайних значений ($R_{\min}$ и $R_{\max}$) по ее оси абсцисс. Способы такого подбора коэффициентов $a-d$ хорошо известны в прикладной математике и приводятся в фирменных описаниях счетчиков.

Таким образом, достаточно ввести в память компьютера (для каждого изотопа, сцинтиллятора и определенной настройки каналов) четыре значения коэффициентов $a-d$, и он сможет по заданной программе обрабатывать цифры счета рабочих препаратов с учетом тушения, а результаты измерений выдавать в виде истинной радиоактивности (распады в минуту). Разумеется, для счета двойной метки придется ввести 12 коэффициентов (для трех кривых тушения).

Эти коэффициенты и данные по настройке каналов вместе с другими заранее выбранными параметрами (продолжительностью счета каждой пробы, необходимой точностью счета, подлежащим вычитанию уровнем фона и др.) называют «программой счета». Программы можно хранить в «памяти» компьютера и вводить в действие вызовом соответствующего номера програм-

мы. Используют самые различные способы введения программ — от телетайпа и машинного языка до простейшей клавиатуры из девяти цифр и нуля, включая варианты с использованием перфокарт, штеккеров и т. д. Вызов программы из памяти компьютера и автоматическая перестройка прибора могут быть осуществлены с помощью «маркера», который устанавливается перед первым флаконом новой серии препаратов. Таким образом, счетчиком могут пользоваться несколько человек, а все необходимые перестройки прибора будут произведены в их отсутствие, как только наступит очередь просчета соответствующей серии препаратов. Для тех, кто не нуждается в особой точности счета, прибор в своей памяти имеет несколько стандартных программ счета с учетом тушения, откалиброванных на заводе. С помощью соответствующего маркера прибору может быть дана команда к использованию одной из этих стандартных программ.

В погоне за удобствами исследователя конструкторы новейших счетчиков освобождают его и от хлопот по отработке программы, т. е. по настройке каналов и снятию экспериментальных кривых тушения. Все эти операции может выполнять командное устройство прибора («микропроцессор») в сочетании с компьютером. Экспериментатору остается только установить в прибор набор стандартов с тушением и «сообщить» значение содержащейся в них истинной радиоактивности. Также без его участия может производиться перестройка прибора для счета любого изотопа. В серию препаратов можно в любом порядке поставить препараты с ^3H , ^{14}C или ^{32}P , и каждый будет просчитан в своих оптимальных условиях счета.

Современные приборы «умеют» также обнаруживать и вычитать из конечного результата счет хемолюминесценции. Все это, вместе с еще целым рядом мелких удобств, освобождает экспериментатора почти от всех забот, кроме установки в счетчик своих препаратов, но и почти лишает его возможности контролировать поведение прибора, а значит, вовремя обнаружить ошибку, связанную с его неисправностью или с неточностью отданной ему команды. Кроме того, усложняются техническое обслуживание, проведение профилактики и ремонта прибора. Это оказывается доступным только специалистам фирмы. Наконец, сильно увеличивается стоимость прибора.

Ввиду этого следует время от времени проверять прибор, например заставляя его просчитать весь набор стандартов радиоактивности с различной степенью тушения для ^3H и ^{14}C . Для всех флаконов прибор должен пропечатать одно и то же значение их истинной радиоактивности.

Не имеет смысла здесь приводить более подробные технические описания и характеристики счетчиков, имеющих на мировом рынке. Такие описания были бы слишком громоздки. Кроме того, под давлением конкуренции модели счетчиков быстро сменяют одна другую, двигаясь все дальше по пути автоматизации. То существенное, что сделано в этом направлении на сегодняш-

ний день, отражено в приведенных замечаниях. Краткие сведения о новейших моделях читатель может найти в фирменных проспектах, которые вряд ли стоит здесь дублировать. Главное же состоит в том, что в основе работы современных процессоров, компьютеров и автоматов лежат те же самые процессы и методы счета радиоактивности, которые были достаточно подробно рассмотрены выше. Это рассмотрение должно облегчить исследователю понимание детального технического описания, которое фирма прилагает к своему прибору.

До сих пор мы рассматривали счетчики с логарифмическим усилителем. Для тех, кто использует счетчики с линейными усилителями, необходимо отметить некоторые принципиальные особенности их настройки.

Настройка двух каналов для регистрации двойной метки (^3H и ^{14}C) в счетчике с линейными усилителями

На примере регистрации двойной метки (без учета тушения) поясним особенности настройки такого счетчика. Напомним, что линейные усилители стоят в каждом канале и что они сохраняют форму спектров амплитуд импульсов такой же, как она изображена на рис. 46 для энергетических спектров разных изотопов. Принцип настройки остается прежним, но имеется возможность воспользоваться разделенными усилителями для обеспечения наилучших условий регистрации импульсов каждого из изотопов в «своем» канале.

Для настройки канала B (углеродного) в прибор помещают стандарт для ^{14}C , ВП_B отодвигают в крайнее положение, где он вообще не влияет на скорость счета, а усиление усилителя канала B устанавливают примерно на 10% от максимального. Затем поднимают положение НП_B , пока счет не окажется максимально сниженным, но еще зависящим от небольших изменений положения НП_B . Это и будет положение установки для ВП_B , когда максимум шумов «отрезается», а импульсы ^{14}C с амплитудой, близкой к максимальной, еще регистрируются. Сравним характер поиска оптимального положения ВП_B с тем, что было описано для логарифмического усилителя. Там положение НП рекомендовалось поднимать до момента резкого падения счета, здесь же такого резкого падения быть не может, так как спектры растянуты именно в своей «правой» части.

Установив ВП_B в найденное положение, вносят в прибор стандарт ^3H и выбирают положение НП_B так, чтобы в канале B только-только начинался счет импульсов трития. Таким образом обеспечивается наиболее полное использование канала B для счета углерода, и только его. Положение порогов канала B иллюстрирует рис. 69.

Для настройки канала A (тритиевого) усиление в нем следует выбрать близким к максимальному, так как энергия излуче-

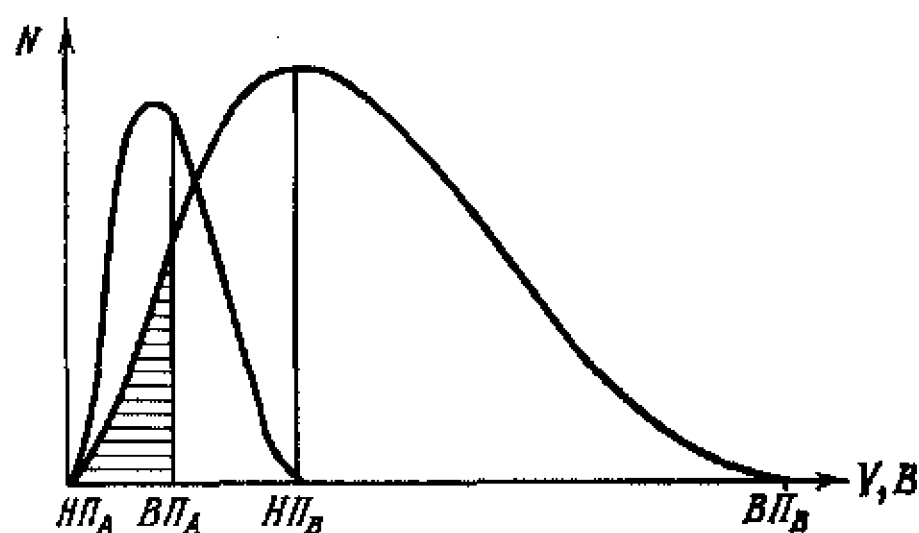


Рис. 69. Спектры амплитуд импульсов и установка порогов при счете двойной метки в счетчиках с линейными усилителями

ния трития мала. После этого в прибор помещают стандарт ^{14}C . Импульсы углерода в канале А благодаря такому усилению будут лежать главным образом в области очень больших амплитуд. Манипулируя положением ВП_A , «отрезают» их так, чтобы счет углерода в канале трития упал примерно до 7% от того, что считается в канале В. Нижний порог НП_A опускают до минимума, соответствующего началу спектра амплитуд трития. Найти этот минимум при выбранном усилении можно так же, как было описано для логарифмического усилителя. «Окно» между двумя порогам канала А будет достаточным, чтобы обеспечить вполне приемлемую эффективность счета ^3H .

Настройка каналов закончена. Теперь с помощью стандартов ^3H и ^{14}C легко определить три необходимые эффективности счета — $E_{\text{т},A}$, $E_{\text{у},B}$ и $E_{\text{у},A}$. Все расчеты производят точно так же, как и в случае логарифмического усилителя. Аналогична и процедура введения поправки на тушение.

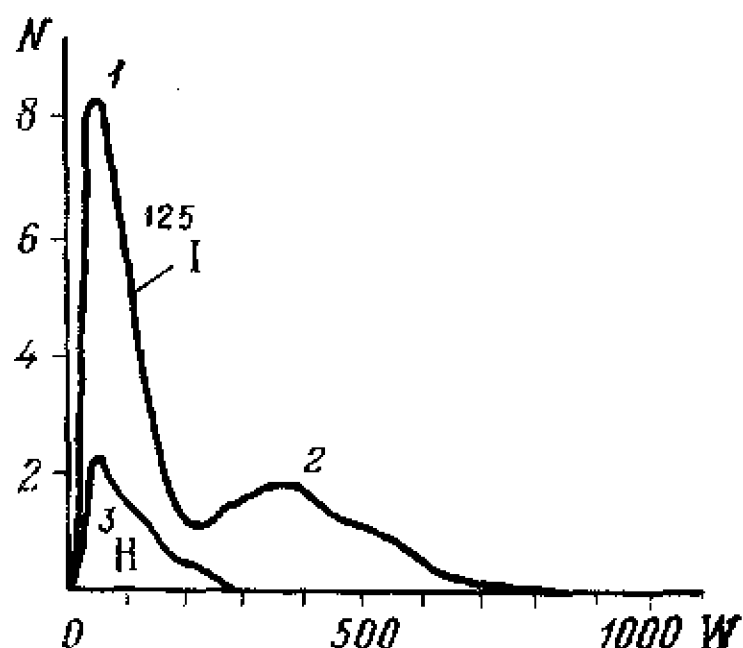
Счет двойной метки (^3H и ^{125}I) в жидкостном сцинтилляционном счетчике

Этот любопытный пример одновременного счета γ -излучения ^{125}I и β -излучения трития (без тушения) описан Кобаяши для смеси ^{125}I -брадикинина и ^3H -лейцина [Kobayashi, 1978]. На рис. 70 совмещены спектры амплитуд ^{125}I и ^3H , снятые при одинаковом усилении (20% от максимального) в двух каналах счетчика «Packard TriCarb 3385». Из рисунка видно, что практически все импульсы, обязанные своим происхождением комптоновским электронам, попадают в область более высоких энергий, чем β -частицы трития. Это позволяет настроить канал В так, чтобы в нем просчитывался только ^{125}I . В канал А, очевидно, наряду с импульсами ^3H будут попадать и импульсы счета электронов Оже, излучаемых при γ -распаде ^{125}I . На их долю приходится довольно значительная часть импульсов γ -излучения, однако описанным приемом вклад электронов Оже можно отделить от счета трития в канале А.

Приведем данные автора о настройке счетчика и значениях эффективности счета иода ($E_{\text{и}}$) и трития ($E_{\text{т}}$). Канал В: усиление — 20% от максимального; НП — на делении 240; ВП — на

Рис. 70. Сопоставление спектров амплитуд импульсов ^{125}I и ^3H при одинаковом усилении линейного усилителя счетчика

N — относительное число импульсов;
 W — положение порога (деления шкалы); 1 — область электронов Оже; 2 — область комптоновских электронов



делении 1000 (последнее соответствует отсутствию ограничения амплитуды); $E_n = 29,1\%$; $E_t = 0,01\%$. Канал А: усиление — 50% от максимального; НП — на делении 10; ВП — на делении 450; $E_n = 26,4\%$; $E_t = 36,7\%$. По этим эффективностям можно вполне надежно подсчитать истинные радиоактивности ^{125}I и ^3H в препарате.

Специфическую двойную метку для гемоглобина крови можно осуществить с использованием двух изотопов железа — ^{59}Fe и ^{55}Fe . Энергия γ -излучения у первого из них значительно выше, чем у второго, соответственно разнесены по амплитудам и спектры комптоновских электронов. Кроме того, ^{55}Fe , в отличие от ^{59}Fe , дает при распаде электроны Оже. Счет можно осуществить в двухканальном γ -счетчике или в β -счетчике.

Глава 2

СПОСОБЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И РЕГИСТРАЦИИ РАДИОАКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ

ПРЕПАРАТЫ В ВИДЕ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

Такие препараты в биологических исследованиях встречаются наиболее часто; к ним относятся физиологические жидкости, фракции с хроматографических колонок или после ультрацентрифугирования, элюаты гелей после электрофореза или пластинок ТСХ, различные реакционные смеси и многое другое. Главная проблема здесь заключается в обеспечении полного растворения значительных объемов водного препарата в органическом растворителе сцинтиллятора. Эта проблема решается двумя способами.

Сцинтилляторы на основе диоксана

Выше упоминалось, что в качестве растворителя, которому β -частицы непосредственно передают свою энергию, в сцинтилляторах можно использовать раствор нафталина в диоксане. Точ-

нее будет называть диоксан первичным растворителем, а нафталин — вторичным (на его долю приходится не более 10%). Концентрация собственно сцинтилляторов (ППО+ПОПОП) еще меньше (более чем на порядок). Таким образом, основная масса сцинтиллятора — это диоксан, а он смешивается с водой в любых пропорциях. Правда, примесь воды ухудшает растворимость нафталина в диоксане, особенно при пониженной температуре. Однако, во-первых, для улучшения растворимости в раствор можно добавить метанол (но не этанол, поскольку он вызывает тушение) и этиленгликоль, а во-вторых, в современных счетчиках с «малошумящими» ФЭУ уже нет необходимости вести счет радиоактивности при пониженной температуре, как это делали раньше.

Ниже приведены рецепты и характеристики двух наиболее употребительных сцинтилляторов на основе диоксана.

Раствор Брея: 60 г нафталина+4 г ППО+0,2 г ПОПОП+100 мл метанола+20 мл этиленгликоля; диоксан до 1 л. Максимальная эффективность счета трития — 30%, ^{14}C — 85%. В 10 мл сцинтиллятора можно вносить до 3 мл водного препарата. Допускается охлаждение до -3° .

Сцинтиллятор с повышенной эффективностью счета: 100 г нафталина+7 г ППО+0,3 г ПОПОП (или диметил-ПОПОП); диоксан до 1 л. Максимальная эффективность счета трития — 35%, ^{14}C — 90%. Добавление до 2 мл воды на 10 мл сцинтиллятора еще очень мало сказывается на эффективности счета, но далее она снижается. Нафталин начинает выпадать из раствора при 12° . Растворяющая способность хуже, чем у раствора Брея (легче выпадают в осадок соли). Сцинтиллятор может расслаиваться, что приводит к заметному падению эффективности счета.

Готовые к употреблению сцинтилляторы (а также солюбилизаторы; см. ниже) выпускает целый ряд фирм, в том числе производителей счетчиков радиоактивности. В последние годы их все больше вытесняет американская фирма «NEN» («New England Nuclear») — поставщик радиоактивных изотопов. Торговые названия различных сцинтилляторов этой фирмы часто встречаются в описаниях экспериментов. Составы их засекречены, но принцип действия и характеристики приводятся в фирменных описаниях. Ввиду их распространенности далее будут упоминаться только сцинтилляторы этой фирмы. В частности, она предлагает диоксановый сцинтиллятор «Aquafluor». В рекламе утверждается, что эффективность счета ^3H в этом сцинтилляторе достигает 40%, а ^{14}C — 90%. На 10 мл сцинтиллятора можно вносить до 2 мл воды.

Хорошими характеристиками обладает и отечественный сцинтиллятор на основе диоксана (ЖС-8).

Казалось бы, использование диоксановых сцинтилляторов полностью решает проблему счета водных препаратов. К сожалению, это не так. Во-первых, указанные значения эффективности счета трития примерно на 20% ниже того, что удастся полу-

чить, используя описываемые ниже «толуол-тритоновые» сцинтилляторы. Но это — не главное. В конце концов, погоня за «рекордной» эффективностью счета носит скорее рекламный, чем деловой характер: уж очень редки случаи, когда возможность просчитать радиоактивность препарата с эффективностью 90% вместо 85% имеет существенное значение. Куда хуже другое. В диоксане и сцинтилляторах на его основе при хранении образуются перекиси, которые, с одной стороны, служат сильными тушителями сцинтилляций, а с другой — в качестве окислителей могут стимулировать хемолюминесценцию.

Перед приготовлением сцинтиллятора диоксан следует обязательно проверить на наличие перекисей. Для этого к 0,5 л диоксана добавляют 1 мл разбавленного водного раствора иодистого калия и 0,5 мл 20%-ной HCl, а затем — несколько капель раствора крахмала. В присутствии перекисей раствор приобретает синюю окраску. Для очистки от перекисей 2 л диоксана кипятят с обратным холодильником в течение часа над 10—15 г SnCl_4 . Делают пробу на присутствие перекисей и, если надо, добавляют еще 5 г SnCl_4 и кипятят еще 30 мин. Далее добавляют 27 мл концентрированной HCl и кипятят с обратным холодильником в течение 12 ч, пробулькивая азот. Для удаления воды и растворенного в ней кислорода после охлаждения медленно добавляют твердый KOH до образования двух фаз. Диоксан с водной фазы сливают и повторяют операцию расслоения с помощью KOH. Затем его кипятят в течение 10—12 ч с обратным холодильником над натрием и перегоняют при атмосферном давлении ($t_{\text{кип}}^{\circ} = 101,3^{\circ}$). Хранить диоксан и диоксановый сцинтиллятор следует без доступа воздуха в темноте.

Для приготовления сцинтиллятора следует брать очень чистый нафталин (сублимированный). Высокая чистота диоксана и нафталина очень важна для точного измерения радиоактивности. Для простого обнаружения и грубой оценки радиоактивности можно использовать продажный диоксан высокой степени чистоты («сцинтилляционный») без дополнительной очистки.

В заключение отметим, что нередко наблюдающееся в диоксановом сцинтилляторе выпадение в осадок соли не снижает эффективности счета. Опасность представляет расслоение сцинтиллятора — отделение солевого раствора вместе с растворенным в нем радиоактивным препаратом. Однако есть один практически важный случай, когда в этом отношении толуол-тритоновые сцинтилляторы уступают раствору Брея. Речь идет о счете радиоактивности во фракциях после сахарозного градиента в тех случаях, когда из-за низкой радиоактивности нельзя ограничиться малыми аликвотами и приходится просчитывать большие объемы концентрированных растворов сахарозы. В толуол-тритоновых сцинтилляторах это часто приводит к расслоению с заметной потерей эффективности счета, тогда как раствор Брея «держит» гораздо более высокую концентрацию сахарозы.

Сцинтилляторы на основе толуола и ксилола

Толуол в качестве растворителя сцинтиллятора обладает явными преимуществами по сравнению с диоксаном. Он не образует перекисей и дешев, а продажные препараты марки «сцинтилляционный» можно использовать без дополнительной очистки. Наконец, он в принципе более эффективен, чем система диоксан—нафталин. *n*-Ксилол еще немного лучше, чем толуол. Проблема заключается в том, чтобы сцинтилляторам на их основе придать способность смешиваться с водой. Ее успешное решение было найдено путем использования для этой цели детергентов, в частности Тритона X-100. Оптимальное соотношение толуола и Тритона X-100 в разных рецептах сцинтилляторов лежит в пределах от 3:1 до 2:1. Тритон несколько снижает эффективность счета, но зато позволяет просчитывать большие объемы водных препаратов. В качестве примера приведем один из рецептов: 1 л толуола+333 мл Тритона X-100+4 г ППО+0,1 г ПОПОП или диметил-ПОПОП. Такой сцинтиллятор при малых объемах водных препаратов позволяет достигнуть эффективностей счета в 50% для ^3H и 95% для ^{14}C . При увеличении объема воды эффективность счета снижается, но вначале очень медленно. Так при внесении 4 мл водного препарата в 10 мл сцинтиллятора она уменьшается лишь на 10—12% от своего максимального значения.

При смешивании толуола и Тритона X-100 их следует подогреть примерно до 45°, а затем в течение нескольких часов выдержать при температуре счета — тогда при малом содержании воды (до 1,4 мл на 10 мл сцинтиллятора) получается истинный раствор. Если объем водного препарата превышает 2,2 мл на 10 мл сцинтиллятора, то образуется очень мелкая эмульсия воды в органике (средний размер капелек — меньше 0,1 мкм). Поскольку свободный пробег β -электронов трития в воде составляет около 0,5 мкм, эффективность счета в такой эмульсии оказывается еще достаточно высокой. В обоих случаях счет радиоактивности устойчив, но постепенно снижается с увеличением содержания воды. В истинном растворе это снижение обусловлено тем, что вода выступает в роли тушителя, а в эмульсии — увеличением среднего размера капелек.

В переходном интервале объемов (1,4—2,2 мл воды на 10 мл сцинтиллятора) лучше не работать: счет оказывается нестабильным, иногда наблюдается расслоение фаз. Есть также данные о наличии резкого «провала» эффективности счета вблизи соотношения 0,2 мл воды на 10 мл сцинтиллятора [Pande, 1976]. В связи с этим не следует считать радиоактивность водных препаратов в толуол-тритоновых сцинтилляторах, если их объем не превышает 0,5 мл на 10 мл сцинтиллятора, — лучше разбавить препарат водой до 1 мл. Если же объем препарата больше 1,4 мл, то его следует разбавить до 2,2 мл, прежде чем вносить в 10 мл сцинтиллятора.

При счете физиологических жидкостей, растворов с высокой концентрацией солей и диссоциирующих агентов оптимальные пропорции толуола и тритона могут быть иными. Например, для счета 8 М раствора мочевины следует использовать соотношение 1 : 1, а для 5%-ного раствора ТХУ — 13 : 7. Уже упоминалось, что присутствие сахарозы в препарате (>5%) заметно ухудшает эффективность счета, поэтому растворы сахарозы следует разбавлять водой. Если же из-за низкого уровня радиоактивности это сделать нельзя, то следует считать в растворе Брея. Щелочь в препарате следует нейтрализовать ввиду опасности возникновения хемолуминесценции.

Если в препарате ожидается высокое содержание тушителей, то вместо ППО и ПОПОП в качестве сцинтиллятора лучше использовать «butyl PBD» (фирмы «NEN»), доводя его концентрацию до 10—12 г/л. Напомним, что молекулы тушителя конкурируют с молекулами сцинтиллятора за «захват» энергии возбуждения растворителя.

Коррекция тушения методом внешнего стандарта применима только в случае истинного раствора воды в сцинтилляторе, т. е. при соотношении 0,5—1,4 мл водного препарата на 10 мл сцинтиллятора. Для эмульсии этот метод применять нельзя! Методом отношения каналов (см. выше) можно пользоваться в обоих случаях, т. е. при любом соотношении объемов воды и сцинтиллятора.

Нередко тушение весьма существенно уменьшается при переходе от раствора к эмульсии (более 2,2 мл воды на 10 мл сцинтиллятора). Это, очевидно, имеет место в тех случаях, когда водорастворимые тушители остаются внутри капелек воды. Их собственная способность к поглощению энергии β -частиц (без передачи через растворитель сцинтиллятора) ничтожно мала.

Растворимость белков и нуклеиновых кислот в толуольном сцинтилляторе обычно улучшается при добавлении небольшого количества какого-либо жирного производного четвертичного аммония. Довольно широкое распространение для этой цели получил, например, препарат с торговым названием («Hyamine hydroxide»). С ним и другими «солюбилизаторами» мы подробно познакомимся ниже, а сейчас лишь отметим, что все это — щелочи, которые при взаимодействии с биологическими молекулами могут стимулировать хемолуминесценцию.

Порядок внесения сцинтиллятора и препарата во флаконы счетчика имеет значение для обеспечения стабильного счета. Следует сначала заливать во флаконы толуольный сцинтиллятор, а потом (хотя это и менее удобно) вносить туда водный препарат и взбалтывать. По-видимому, смачивание стекла уменьшает полноту растворения или эмульгирования водного препарата в сцинтилляторе. Кстати, эмульсия препарата в толуол-тритоновом сцинтилляторе может быть не вполне прозрачной, но это вполне нормально.

Подводя итоги, следует отметить, что эффективность счета и особенно стабильность при хранении у толуол-тритоновых сцинтилляторов настолько выше, чем у диоксановых, что они почти вытеснили последние из практики современных лабораторий.

В качестве примера сцинтиллятора на основе *n*-ксилола приведем сравнительно недавно опубликованный рецепт смеси, названной «тритозол» [Fricke, 1975]: 600 мл *n*-ксилола, 257 мл Тритона X-100, 106 мл этанола и 37 мл этиленгликоля. По данным автора, эффективность счета ^3H в тритозоле достигает 47%, а ^{14}C — 87%. Эти значения не очень высоки, но зато в данном сцинтилляторе можно просчитывать 10%-ный раствор сахарозы, 5 М мочевины, 1 М HCl и 0,5 М NaOH. На 10 мл сцинтиллятора можно вносить до 3 мл водного препарата.

Приведем торговые названия и краткие характеристики широко распространенных сцинтилляционных смесей фирмы «NEN».

«Aquasol» и «Aquasol-2» представляют собой сцинтилляторы на основе *n*-ксилола. Эффективность счета трития в них сохраняется на уровне 30% и 35% соответственно при добавлении к 10 мл сцинтиллятора 1 мл таких растворов, как 20%-ная сахароза, 8 М мочевина, 5%-ная ТХУ, 0,5 М HCl и 0,5 М NaOH. При смешивании 10 мл водного препарата (!) с 10 мл сцинтиллятора «Aquasol-2» можно считать радиоактивность ^3H с эффективностью 20%.

«Biofluor» позволяет определять радиоактивность ^3H в присутствии тех же добавок с эффективностью 45%. Допускается внесение до 2 мл водного препарата на 10 мл сцинтиллятора. Провал счета радиоактивности при малых количествах препарата отсутствует. ^{125}I можно просчитывать в сцинтилляторах «Aquasol» и «Biofluor» с эффективностью 50—60%.

«Econofluor» удобен в комбинации с солюбилизаторами биологических препаратов — при этом устраняется опасность возникновения хемолуминесценции.

«Riafluor» — специальный сцинтиллятор для использования в конкурентном радиоиммунном методе исследования (см. ниже).

Для общего знакомства ограничимся перечислением нескольких торговых названий сцинтилляторов других фирм: «Instagel» («Packard»); «Readysolv» («Beckman»); «PCS», «ACS» («Amersham»); «Unisolve» («Koch-Light»).

Надо заметить, что особой необходимости в приобретении дорогостоящих фирменных сцинтилляторов нет. Строго воспроизводя рецептуру и позаботившись о чистоте исходных реактивов, исследователь может иметь в своем распоряжении надежный и дешевый сцинтиллятор, приготовленный в лабораторных условиях. По эффективности счета он лишь немного будет уступать лучшим образцам продажных сцинтилляционных смесей.

Некоторые дополнительные замечания

Выбор объема сцинтиллятора связан с геометрией прибора — с размерами и расположением фотокатодов ФЭУ. Обычно оптимальный объем лежит в интервале 10—15 мл. Для объема 5 мл снижение эффективности счета еще мало заметно. Фильтры, лежащие на дне флакона, можно просчитывать и в объеме 2 мл, так как область сцинтилляций все равно ограничена близкой окрестностью поверхности фильтра.

При хранении флаконов с препаратами, растворенными в сцинтилляторе, особенно при малых количествах препарата, может наблюдаться постепенное снижение счета. Причиной этого служит сорбция препарата на стекле флакона, в результате чего препарат постепенно выходит из сцинтиллятора. Уже отмечалось, что это явление особенно опасно при счете двойной метки. Ослабленная за счет самопоглощения в сорбированном слое, радиоактивность одного изотопа может просчитываться как радиоактивность другого (с меньшей энергией излучения).

При просчете фракций после центрифугирования в градиенте плотности раствора CsCl в толуол-тритоновом сцинтилляторе аликвоты следует разбавлять водой по крайней мере в отношении 2:1, причем объем разбавленного раствора не должен превышать 1 мл на 10 мл сцинтиллятора. Это связано с тем, что очень высокая концентрация соли мешает воде взаимодействовать с детергентом, поэтому раствор оказывается нестабильным. По той же причине насыщенные растворы сульфата аммония для просчета радиоактивности надо разбавлять в 10 раз (!). Как уже упоминалось, 20—30%-ный раствор сахарозы, в зависимости от используемого сцинтиллятора, иногда тоже приходится разбавлять водой.

Во всех этих случаях критерием пригодности для счета является гомогенность (не обязательно прозрачность, но однородность) раствора препарата в сцинтилляторе. Каждый флакон перед его установкой в прибор следует внимательно осмотреть.

При просчете радиоактивности ^{14}C -бикарбоната может иметь место выделение $^{14}\text{CO}_2$ и установление равновесия жидкость—газ во флаконе, причем в счете будет участвовать только $^{14}\text{CO}_2$, растворенный в жидкости. С этим можно бороться путем защелачивания сцинтиллятора, например добавлением в него 1 мл 0,1 М раствора NaOH. При этом, однако, следует контролировать возможность хемотропной люминесценции.

Были опубликованы любопытные, а для соответствующих количественных исследований — очень важные данные о том, что счет ^3H -аминоацил-тРНК в растворе и на фильтрах может в три раза превысить счет эквивалентного количества ^3H -аминокислоты. Было предположено, что ППО и ПОПОП ассоциируют с тРНК, тем самым увеличивая эффективную концентрацию сцинтилляторов вблизи слабого β -эмиттера [Haertlé, Augustyniak, 1978]. В более поздней работе эти данные подтвердились только

для счета на фильтрах [Kraal, Swart, 1980], так что вопрос заслуживает дальнейшего выяснения.

В некоторых случаях, например при просчете фракций после хроматографического разделения смеси компонентов малой исходной активности, приходится вносить в сцинтиллятор каждую фракцию целиком, а затем извлекать ее обратно для дальнейшего анализа. Для нуклеозидов, аминокислот и сахаров в этом случае рекомендован следующий прием. Фракции с колонки вносят во флаконы счетчика и там сушат, продувая теплый воздух. Затем заливают по 1 мл метанола, перемешивают и добавляют по 5 мл раствора ПНО (4 мг/мл) и ПОПОП (0,1 мг/мл) в толуоле (без тритона X-100). Эффективность счета в таком метанол-толуольном сцинтилляторе оказывается высокой: 32,4% для ^3H и 83,2% для ^{14}C . После просчета радиоактивности в каждый флакон вносят по 2 мл воды и энергично встряхивают в течение 1 мин. Дают разделиться двум фазам и нижнюю (водную) отсасывают пастеровской пипеткой. Верхнюю фазу еще два раза экстрагируют так же. Объединенные водные фазы дважды экстрагируют половинным объемом толуола и дважды — таким же объемом эфира, а затем сушат в пленочном испарителе. Выход препарата — более 90%. Его можно далее анализировать методом ТСХ [Saffhill, 1981].

СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Многие биологические объекты (клетки и их компоненты, микроорганизмы, а также осажденные из реакционных смесей белки и нуклеиновые кислоты) бывает трудно перевести в водный раствор. Для этого требуется разрушить высшие структуры и зачастую осуществить глубокий гидролиз биополимеров. Такой процесс солюбилизации должен предшествовать счету радиоактивности, если его предполагается вести в растворе, как было описано выше.

Простейший способ солюбилизации — обработка препарата горячим концентрированным раствором щелочи, например 5 М КОН при 70° в течение 1—4 ч. После охлаждения и нейтрализации раствор вносят в толуол-тритоновый сцинтиллятор. Примесь радиоактивного ^{40}K в КОН обычно не превышает 0,012% — это лишь незначительно увеличивает уровень фона. NaOH для этой цели использовать не рекомендуется, так как образующиеся радиоактивные натриевые соли гораздо хуже растворяются в сцинтилляторе, чем калиевые. Использование для гидролиза концентрированного аммиака дает очень хорошие результаты, но имеется риск образования летучих радиоактивных продуктов и соответствующих потерь радиоактивности с ними. Метод горячего щелочного гидролиза привлекает своей простотой и дешевизной, но растворение не всегда оказывается полным. Белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды можно попробовать растворить в

диметилсульфоксиде. Иногда для солюбилизации биологических препаратов используют энергичное окисление. Например, в смеси, содержащей 60% HClO_4 и 30% H_2O_2 , 100 мг животной ткани удается растворить при 70—80° за 1—2 ч.

В настоящее время для солюбилизации широко применяют жирные производные четвертичного аммония, в состав которых входят алкильные заместители, содержащие от 6 до 20 атомов углерода. Это — тоже сильные щелочи, но, в отличие от аммиака, они не дают летучих продуктов гидролиза и, кроме того, в определенной степени являются детергентами. Именно к этой категории относится уже упомянутый гиамингидроксид. Его обычно используют в виде 1 М раствора в метаноле. 50 мг ткани в 0,5 мл такого раствора растворяются при 45° за 10—24 ч. При растворении сухих препаратов следует предварительно дать им набухнуть в воде. К сожалению, у гиамингидроксида есть существенный недостаток — он вызывает довольно сильное (по сравнению с другими солюбилизаторами) тушение. В продаже имеется целый ряд фирменных солюбилизаторов такого же типа, например «Solucene-100» и «Solucene-350» фирмы «Packard» или довольно широко распространенный «NCS» («Nuclear Chicago Solubilizer»).

Приведем некоторые фирменные рекомендации по использованию NCS. Для солюбилизации измельченной ткани или ее гомогената (4 : 1) добавляют шестикратный объем (NCS) и выдерживают при 50° до полного растворения. Для обесцвечивания гидролизата на каждый 1 мл NCS рекомендуется добавить 0,3 мл перекиси бензоила и поддерживать еще 30 мин при 50°. Лиофилизированный препарат следует увлажнить и обработать так же. При необходимости просчитать водный раствор радиоактивной неорганической соли во избежание ее выпадения в осадок рекомендуется предварительно добавить в сцинтиллятор четырехкратный по отношению к раствору соли объем NCS. Если препарат находится в ПААГ, то для его растворения и элюции из геля срез последнего толщиной 1—2 мм (<50 мг) помещают во флакон, добавляют туда 0,5—1 мл смеси NCS — вода (9 : 1) и, завинтив флакон, выдерживают 2 ч при 50°.

Фирма «Beckman» предлагает солюбилизатор другого типа — «Bio-Solv» (состав точно не известен). Одна из марок этого солюбилизатора (BBS-3) позволяет вводить в толуольный сцинтиллятор раствор радиоактивной соли высокой концентрации, другая (BTS) предназначена для быстрой (за 3—5 ч) солюбилизации гомогенатов тканей при 55°.

Используемое почти всегда нагревание солюбилизаторов до 50—55° заметно ускоряет растворение, но не следует превышать этот уровень температур из-за развития интенсивной окраски, приводящей к оптическому тушению. С солюбилизаторами всегда используют толуольные сцинтилляторы, так как в диоксано-вых они возбуждают сильную хемолюминесценцию даже в отсутствие препарата. О полноте растворения судят по прозрачности сцинтиллятора.

Фирма «NEN» предлагает также солюбилизатор в виде 0,5 М раствора некоего замещенного четвертичного аммония под торговым названием «Protosol». До 150 мг ткани можно растворить в 1 мл Protosol при 55° за 3—6 ч (или за ночь при комнатной температуре). В случае развития окраски рекомендуется обесцвечивание перекисью водорода (0,1 мл 30% H_2O_2 на препарат в течение 30 мин при 55°). Затем растворенный препарат вносят в 10 мл Biofluor или Econofluor, энергично встряхивают, дают уравновеситься в течение часа и лишь после этого считают. Иногда во избежание хемолуминесценции в сцинтиллятор добавляют еще 0,5 мл 0,5 н HCl . Отметим, что кислоту следует добавлять только после растворения солюбилизованного препарата в сцинтилляторе. Любопытно, что белки при этом редко выпадают в осадок, хотя их гидролиз не проходит до конца. Вероятно, они защищены от агрегации взаимодействием с солюбилизатором как с детергентом. Следует упомянуть, что обработка препаратов солюбилизаторами типа Soluene и Protosol прямо на нитроцеллюлозных фильтрах приводит к появлению окрашенных продуктов за счет нитроцеллюлозы. Фильтры из ацетилцеллюлозы окраски не дают.

В качестве способа растворения одно время довольно широко использовали сжигание биологических препаратов в специальных автоматизированных приборах, например «Oxidizer Model 306» (фирмы «Packard»). Сжигание проводилось при высокой температуре до конца — до образования CO_2 и H_2O . Таким образом, весь ^3H оказывался в составе радиоактивной воды, которую собирали конденсацией, а весь ^{14}C — в составе CO_2 , который полностью захватывался специальным жидким поглотителем («Oxisorb-2» и «Oxisorb- CO_2 » фирмы «NEN»). После этого две жидкости порознь автоматически смешивали со сцинтилляторами в двух разных флаконах, что позволяло отдельно просчитать компоненты двойной метки препарата. Сейчас метод сжигания используют редко — только в качестве контрольного метода ввиду его абсолютного характера. Прибор дорог, производительность его невелика, а разработанные в последние годы солюбилизаторы конкурируют с ним весьма успешно.

При некоторых биохимических экспериментах возникает необходимость захвата и просчета радиоактивности $^{14}\text{CO}_2$ (например, при проведении соответствующей ферментативной реакции в колбе Варбурга или при регистрации дыхания подопытного животного). Для этой цели можно использовать фильтр, смоченный β -фенилэтиламином. Образующийся карбонат плохо растворим в толуоле, но хорошо — в метаноле. В виде такого раствора его потом и вносят в сцинтиллятор. Еще полнее поглощает CO_2 описанный выше солюбилизатор Protosol фирмы «NEN».

СЧЕТ РАДИОАКТИВНОСТИ НА ФИЛЬТРАХ

Подготовка препаратов к счету

Следует различать два варианта приготовления радиоактивных препаратов на фильтрах для их просчета в жидком сцинтилляторе. Первый — это чисто механическое задержание белков и нуклеиновых кислот после осаждения их кислотой, этанолом или иным способом из реакционной смеси или из разделенных фракций. Для этой цели употребляются кружочки толстой фильтровальной бумаги (например, «Whatman 3ММ») или стекловолокнистые фильтры типа GF/A-C с размерами пор 0,45—1,2 мкм. Второй вариант — это молекулярная сорбция на мембранных фильтрах из нитроцеллюлозы. Такие фильтры прочно сорбируют многие белки (особенно щелочные), рибосомы, мРНК и одноницевые молекулы ДНК. Чаще всего употребляют мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм, хотя это и не обязательно, поскольку задержание препарата на фильтре обусловлено в этом случае его сорбцией, а не размером молекул или частиц. Из числа наиболее употребительных марок мембранных фильтров можно назвать BA-85 («Schleicher und Schüll», ФРГ), «Millipore HA» или «HAWP» («Millipore», США и Франция), SM-11306 («Sartorius», ФРГ).

Следует отметить важное для счета радиоактивности различие по характеру расположения препаратов между мембранными и бумажными или стекловолокнистыми фильтрами. Сорбированный на мембранном фильтре материал распределен в виде мономолекулярного слоя по поверхности фильтра и поэтому полностью контактирует со сцинтиллятором. В случае использования любого из так называемых «глубинных» фильтров часть материала проникает в глубь фильтра, что может затруднять его контакт со сцинтиллятором. Последнее явление не следует путать с самопоглощением β -радиоактивности в крупных агрегатах белкового или нуклеинового осадка. Кстати, для задержания осадков можно использовать и мембранные фильтры, хотя это дорого и не сулит преимуществ, поскольку механизм молекулярной сорбции здесь уже роли не играет.

К варианту счета радиоактивности на фильтрах можно отнести просчет полосок или «пятен», вырезанных после проведения хроматографии или электрофореза на бумаге.

Фильтры вырезают или приобретают готовыми в виде кружков диаметром 24—25 мм, что позволяет без труда вносить их во флаконы сцинтилляционного счетчика. Процесс фильтрования ведут с помощью самодельного или фирменного фильтровального устройства (рис. 71). Раствор, содержащий сорбируемые молекулы, или суспензию осадка заливают в верхний резервуар и при небольшом разрежении просасывают через фильтр, который благодаря разъемной конструкции резервуара легко установить и снять со стеклянной пористой подложки.

За любым вариантом задержания исследуемого радиоактивного препарата на фильтре в тех случаях, когда в фильтруемой жидкости есть «лишняя» свободная радиоактивность (например, радиоактивные предшественники синтеза биополимера), следует удаление этой радиоактивности с фильтра путем многократной его промывки. При счете единичных фильтров промывку можно провести в том же фильтровальном устройстве, заполняя его резервуар последовательно 5—6 сменами промывной жидкости, не способной растворить осадок (часто той же, в которой велось осаждение биополимера, например 5%-ной ТХУ или этанола). Промывную жидкость не следует просасывать быстро во избежание образования непромывающихся застойных зон. Для большого числа фильтров такая промывка оказывается слишком трудоемкой и длительной. В этом случае фильтры промывают «в объеме», сразу большими партиями, сменяя промывные жидкости через каждые 15 мин из расчета по 10 мл на один фильтр. Предварительно фильтры нумеруют у края карандашом. Во время каждой промывки жидкость периодически взбалтывают.

Для осадков белков и нуклеиновых кислот можно рекомендовать следующую очередность промывок: три раза холодной 5%-ной ТХУ, два раза этанолом, один раз смесью этанол—эфир (3:1) и один раз эфиром. Последние две промывки предназначены для удаления следов воды. Она препятствует смачиванию фильтра толуольным сцинтиллятором, в котором фильтры просчитывают после предварительного высушивания их на воздухе в течение 10—15 мин при комнатной температуре (до исчезновения запаха эфира).

Несмотря на тщательную промывку, нередко можно обнаружить значительный фон радиоактивности за счет неспецифической сорбции молекул предшественника на материале фильтра или на самом осадке биополимера. Для его уменьшения имеет смысл добавить в ТХУ «холодный» предшественник в 100-кратном избытке по отношению к радиоактивному. При исследовании белкового синтеза им может служить идентичная радиоактивной аминокислота, при изучении синтеза нуклеиновой кислоты — соответствующий нерадиоактивный нуклеозидтрифосфат или, что дешевле, просто пирофосфат, поскольку сорбция трифосфатов идет, как правило, по остаткам фосфорной кислоты. Кстати, пирофосфат — мощный ингибитор синтеза нук-

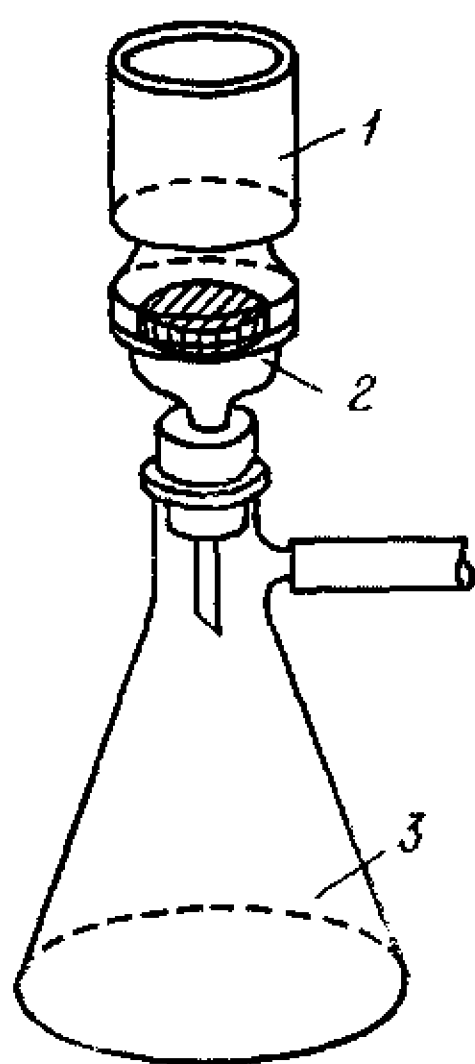


Рис. 71. Прибор для фильтрования с разрежением

1 — верхний резервуар со шлифованным фланцем; 2 — стеклянный пористый фильтр со шлифованным фланцем (рабочий фильтр кладут на стеклянный, фланцы сжимают пружинными зажимами); 3 — колба Бунзена

леиновых кислот, поэтому его нередко используют для мгновенной остановки такого синтеза, добавляя прямо в инкубационную смесь.

В случае малых объемов инкубационной смеси или для просчета малых аликвот не обязательно проводить предварительное осаждение и собирать осадок путем фильтрования. До 50 мкл реакционной смеси или раствора биополимера после фракционирования переносят на кружок из толстой фильтровальной бумаги, дают жидкости впитаться и фильтр слегка подсушивают. Эту операцию можно провести для нескольких десятков пронумерованных фильтров, ряд за рядом наколотых булавками на слой резины, так что они его не касаются. Затем вместе с булавками фильтры помещают в стакан с 5%-ным раствором ТХУ, где осаждение полимера идет уже внутри фильтра. Одновременно начинается отмывка предшественников. С булавок фильтры снимать не следует, так как это предохраняет их от слипания.

Иногда даже саму реакцию, например синтез белка или аминокислотилирование тРНК, ведут прямо на фильтрах. Наносят на серию наколотых, как описано, фильтров все компоненты инкубационной смеси и помещают резину с фильтрами во влажную камеру, термостатированную при температуре реакции. По окончании фильтры слегка подсушивают и помещают в раствор ТХУ.

Можно использовать и хроматографический метод отмывки предшественников. В 5—6 см от края листка «Whatman 3ММ» карандашом рисуют ряд пронумерованных квадратиков размером 2×2 см, наносят на них по 25 мкл препарата, подсушивают и край бумаги опускают в «лодочку» хроматографической камеры, заполненной 5%-ным раствором ТХУ. Когда фронт кислоты уйдет на расстояние 10 см за линию квадратиков, все кислоторастворимые радиоактивные предшественники будут из них отмывы. Полоску можно вырезать, обработать этанолом и эфиром, как указано выше, подсушить, а затем разрезать на отдельные квадратики для просчета.

Для фракций, полученных с хроматографической колонки или после градиентного центрифугирования, проблемы отмывки предшественников не существует. Препараты на фильтрах достаточно осадить однократной обработкой ТХУ, а затем только удалить воду с помощью этанола и эфира.

Подчеркнем еще раз важность полного удаления воды. В противном случае внутренний, сохранивший остатки воды объем фильтра окажется недоступным для сцинтиллятора, а находящаяся в нем часть радиоактивности останется непросчитанной. Хорошо высушенный бумажный фильтр в толуольном сцинтилляторе выглядит полупрозрачным и однородным. Если в нем заметны неоднородности или блестящие пузырьки, значит, вода удалена не полностью, так что следует повторить обработку спиртом с эфиром.

В одном осадке на фильтре можно дифференцировать включение одного и того же изотопа (например, ^{14}C из общего пред-

шественника — бикарбоната) в РНК, ДНК и белки. Для этого надо воспользоваться известными приемами избирательного растворения и вымывания из осадка одного из этих биополимеров за другим. Сначала, путем обработки 0,5 М NaOH при 37° в течение 40 мин, частично гидролизуют РНК — она становится кислоторастворимой и вымывается 5%-ным раствором ТХУ. Далее обработка тем же раствором ТХУ, но при 80° в течение 30 мин делает кислоторастворимой ДНК, и ее тоже можно вымыть из осадка холодной ТХУ. Остающаяся радиоактивность принадлежит белкам. После каждого промежуточного просчета радиоактивности толуольный сцинтиллятор отмывают эфиром или же проводят три различные обработки трех «параллельных» фильтров с одинаковыми количествами исходного препарата. Результаты получаются не слишком точными, как всегда, когда они зависят от полноты растворения. В частности, при растворении ДНК температуру не следует поднимать выше 80° из-за опасности частичного растворения белка.

Иногда требуется просчитать целые микроорганизмы, например для контроля за включением в них радиоактивности. Их можно также собирать фильтрованием, фиксировать обработкой ТХУ и отмывать от предшественников, как описано для осадков биополимеров.

Качественно за включением ^{32}P можно наблюдать еще проще. 2 мкл суспензии бактерий наносят на нитроцеллюлозный мембранный фильтр, и бактерии сорбируются. Радиоактивную среду удаляют промывкой фильтра 0,15 М NaCl. Затем регистрируют черенковское излучение, погрузив фильтр в 10 мл воды.

Обработку монослоев белков, рибосом или нуклеиновых кислот, сорбированных на *мембранных* фильтрах, производят в основном так же, как и осадков (ТХУ→спирт→эфир). Подробнее такая обработка будет описана при рассмотрении методов гибридизации биополимеров на мембранных фильтрах.

Полоски и пятна, вырезанные из бумаги после хроматографии или электрофореза, нарезают кусочками и высыпают во флакон со сцинтиллятором. Так же можно поступать после тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках с пластиковыми подложками. После ТСХ на стеклянных пластинках целлюлозу или силикагель из пятна выскребают и в сухом виде погружают в сцинтиллятор. При этом почти неизбежны потери порошка. Их можно избежать, воспользовавшись следующим изящным приемом. Растворяют несколько нитроцеллюлозных фильтров до весовой концентрации 1—2% в смеси этанол—эфир или этанол—ацетон (1 : 1). Контур пятна на пластинке процарапывают иглой, а затем на него наносят 1—5 капель (в зависимости от размера пятна) раствора нитроцеллюлозы. При высыхании растворителя образуется «лепешка» из нитроцеллюлозы, которая отслаивается от стекла. Ее пинцетом переносят во флакон со сцинтиллятором. Эффективность счета — такая же, как на бумажном фильтре [Titchinsky, Shershneva, 1973].

Во всех случаях работы с фильтрами (и порошками) надо убедиться в том, что радиоактивность не переходит с фильтра в сцинтиллятор. В противном случае счет будет невоспроизводимым, а при повторном использовании сцинтиллятора (как это обычно практикуется при счете на фильтрах) и просто неверным.

Убедиться в этом несложно, просчитав сцинтиллятор после удаления из него фильтра. Если радиоактивность с фильтра вымывается в сцинтиллятор, то лучше перейти на полную предварительную элюцию радиоактивного препарата с бумаги или порошка, например в 0,5 н. HCl, и считать его в растворенном виде.

С ионообменных фильтров («Whatmann DE-81»), где ионная фиксация молекул идет во всей толще фильтра, нуклеотиды или короткие олигонуклеотиды лучше элюировать 0,5 М раствором NaCl в 1 М HCl. Полимерные нуклеиновые кислоты с этих фильтров элюировать трудно.

Эффективность счета. Выход радиоактивности

При счете радиоактивности на фильтре эффективность счета снижается по сравнению со счетом в растворе по целому ряду причин. Если препарат в виде осадка лежит на поверхности фильтра или частично внутри него, то нельзя избежать самопоглощения части энергии β -частиц в самом материале осадка. Энергия β -частиц будет растрачиваться и на соударения с пространственной сеткой фильтра. Кроме того, возможны случаи, когда фотоны, образовавшиеся в сцинтилляторе внутри фильтра, не смогут в достаточном для регистрации количестве достигнуть обоих ФЭУ. Таким образом, оказывается, что часть β -частиц или вовсе не дает вспышек — не выходит в сцинтиллятор, или как бы не дает их (если ФЭУ их «не видят»). Это явление количественно описывается понятием *«выход радиоактивности»*. Имеется в виду доля полной радиоактивности, заведомо достигнувшая свободного объема сцинтиллятора. Будет она просчитана полностью или нет — определяется уже *эффективностью* счета (данного изотопа в данном сцинтилляторе при данной регулировке прибора).

Таким образом, выход радиоактивности и эффективность счета — это понятия разные. Оба они характеризуют потери счета радиоактивности, но происходят эти потери по совершенно разным причинам. В случае растворения препарата в сцинтилляторе выход радиоактивности заведомо равен 100%, а эффективность счета может оказаться и невысокой. При счете на фильтре эффективность может быть и хорошей (например, 90% для ^{14}C), а выход нередко лежит в пределах 10—40%. Произведение этих двух величин, учитывающее все потери, можно назвать *«эффективным выходом счета радиоактивности»*.

На выход радиоактивности при счете на фильтре весьма влияет плотность и расположение осадка. Следует добиваться равномерного распределения осадка, по возможности не очень обильного, по всей площади фильтра. Обильность необходимого для

счета осадка зависит, конечно, от удельной радиоактивности материала. Когда она очень мала, осадок приходится увеличивать. Но не следует гнаться за высоким уровнем счета ценой увеличения плотности осадка — надежнее подольше просчитать препарат. Следует проявлять осторожность и в использовании холодных носителей для соосаждения. Самопоглощение на стекловолоконистых фильтрах существенно проявляется, начиная примерно с плотности осадка в 1 мг/см^2 .

Снижение выхода радиоактивности за счет самопоглощения в осадке страшно не само по себе, а своей невоспроизводимостью. Все зависит от структуры осадка, от степени его смачиваемости сцинтиллятором. Структура же осадка определяется ходом трудно контролируемого процесса осаждения. Желательно получить рыхлый, равномерный слой осадка, без комков. Для этого надо поварьировать способ осаждения. Например, при осаждении белка из инкубационной смеси 5%-ным раствором ТХУ добавление соответствующего малого количества концентрированной кислоты может привести к образованию плотного комка, в то время как консистенция осадка при добавлении равного объема 10%-ного раствора ТХУ может оказаться вполне приемлемой. Нередко, когда нужно осадить радиоактивный материал из объема 0,1—0,2 мл, его имеет смысл сначала разбавить примерно десятикратным количеством холодной воды, а затем уже добавлять ТХУ, цетавлон или другие осаждающие агенты. Наиболее воспроизводимые результаты получаются в тех случаях, когда осадок образуется по всему объему рыхлыми хлопьями, напоминающими хлопья снега. Есть данные, что равномерность распределения слоя белкового осадка на бумажном фильтре улучшается при добавлении в препарат до 0,05—0,1 М NaOH [Durham, Lopez-Solis, 1979].

Немалую роль в улучшении выхода радиоактивности может сыграть обеспечение прозрачности самого фильтра. В частности, для этого важны полная смачиваемость материала фильтра толуолом и надежное высушивание фильтра. Лучшие результаты в этом плане дают стекловолоконистые фильтры типа GF/A-C. Для трития эффективный выход счета осадка на таком фильтре может достигать 10%, в то время как на бумажном фильтре удастся просчитать лишь около 2% радиоактивности.

Положение фильтра во флаконе не играет существенной роли. Выигрыш счета от вертикальной ориентации фильтра невелик, а воспроизводимость ухудшается. Лучше укладывать все фильтры одинаково — на дно флакона, слоем осадка вверх. Объем сцинтиллятора при этом можно уменьшить до 2—5 мл.

Как ясно из изложенного, эффективный выход счета радиоактивности на фильтрах сильно зависит от характера осадка. Однако при некотором навыке можно добиться определенного постоянства этого характера и получить, например, линейную зависимость счета аликвот на фильтрах от времени инкубации системы белкового синтеза *in vitro*.

Таким образом, для относительных измерений радиоактивности метод счета на фильтрах пригоден и удобен. Этого нельзя сказать об определениях абсолютной радиоактивности препарата. Ни один из описанных ранее методов оценки эффективности счета здесь не пригоден, так как они не позволяют определить выход радиоактивности. Приблизленно величину эффективного выхода счета на фильтрах можно оценить, смоделировав условия формирования и сбора осадка для точно известной радиоактивности аналогичного по своей природе препарата. Аналогия должна быть достаточно надежной. Например, нельзя определять эффективный выход счета белка на фильтре путем нанесения на него раствора радиоактивной аминокислоты. Это может привести к ошибке в несколько раз, причем в сторону как завышения, так и занижения выхода: хотя аминокислота и не образует плотного осадка, но зато проникает в глубь фильтра [Albright et al., 1978].

Естественно, что проблему неопределенности выхода радиоактивности можно снять путем растворения собранного на стекловолоконистом фильтре препарата с помощью рассмотренных выше солюбилизаторов. Так, фильтр типа GF с осадком белка или нуклеиновой кислоты можно обработать в течение 5 мин при 60° 0,5 мл Protosol, затем добавить 10 мл Econofluor и 50 мкл уксусной кислоты (для подавления хемотрюминесценции). Выход радиоактивности при этом увеличивается до 80—90%, и при эффективности счета ^3H около 47% можно получить эффективный выход счета для трития около 40%.

Еще более полный, 100%-ный выход радиоактивности получается при сочетании растворения осадка с растворением самого фильтра. Растворение мембранных фильтров можно осуществить с помощью ряда органических растворителей. Здесь надо проявлять осторожность, чтобы гарантировать растворение осадка, который при растворении фильтра (например, в диоксане) может в нерастворенном виде сесть на дно флакона со сцинтиллятором. В большинстве случаев лучше начать с гидролиза осадка еще на фильтре, например 1 М NH_4OH при 60° в течение часа или (для ДНК) 0,5 М HCl в течение 20 мин на кипящей бане и т. д., а затем уже растворить и сам фильтр для полноты освобождения препарата. Для растворения осадков пригодны перечисленные выше фирменные солюбилизаторы. Между прочим, мембранные поликарбонатные фильтры (фирмы «Nucleopore») растворяются в солюбилизаторе Protosol при 55° за 10 мин. В этом случае осадок можно растворить одновременно с фильтром. Чисто нитроцеллюлозные фильтры (фирмы «Schleicher und Schüll») полностью растворяются в этилцеллозольве (моноэтиловом эфире этиленгликоля). Фильтры на основе смешанных эфиров целлюлозы (фирмы «Millipore») растворяются в метилцеллозольве и этилацетате.

При работе с сорбированными на мембранных фильтрах мономолекулярными слоями белков или нуклеиновых кислот филь-

тры можно растворять, не заботясь о предварительном гидролизе препаратов. Ввиду ничтожности их количества эти препараты перейдут в раствор, не образовав осадка.

Счет радиоактивности порошков

Тонкую суспензию порошка с сорбированным на нем радиоактивным препаратом можно с хорошей эффективностью считать в жидком сцинтилляторе, если помешать оседанию порошка на дно, что приводит к значительному самопоглощению. С этой целью в сцинтиллятор вносят добавки, которые, несмотря на их малое содержание, сообщают растворителю сцинтиллятора высокую вязкость, достаточную для предотвращения оседания порошка. Наиболее распространенным агентом такого рода является «Cab-o-Sil» — субмикроскопические частицы коллоидального кремнезема в виде цепей с большой удельной поверхностью ($\sim 200 \text{ м}^2/\text{г}$). В концентрации 3—5% этот агент сообщает любому сцинтиллятору свойства почти прозрачного геля.

СЧЕТ РАДИОАКТИВНОСТИ ПОСЛЕ ТСХ И ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ГЕЛЕ

По окончании электрофореза радиоактивных препаратов из трубок геля вырезают диски диаметром 5—8 мм и толщиной 1—2 мм, а из пластин — полоски или пятна для подсчета в них радиоактивности отдельных фракций. Нередко диски или полоски режут «вслепую» — равномерно по длине геля, но это нецелесообразно. Два пика одинаковой интенсивности и ширины могут в этом случае оказаться представленными совершенно по-разному. Один из них может попасть в диск целиком, и вся его радиоактивность будет просчитана в этом диске. Другой пик может оказаться разрезанным на две равные части, так что будет одинаково просчитан в двух дисках; это создаст представление о вдвое более широкой фракции с вдвое меньшей, чем в первом случае, концентрацией радиоактивного вещества. Целесообразно сначала обнаружить полосы и пятна с помощью окраски или автордиографии (см. ниже), а затем для счета вырезать из геля только сами полосы и пятна.

При просчете радиоактивности таких фрагментов геля встают те же проблемы учета снижения выхода радиоактивности, что и для фильтров, но здесь они еще серьезнее как ввиду бóльшей толщины срезов геля и расположения препаратов целиком внутри них, так и в связи с бóльшей трудностью проникновения сцинтиллятора внутрь геля по сравнению с фильтром. Поэтому главные усилия были направлены на поиски наиболее радикального способа решения проблемы полного растворения геля. Ниже речь будет идти о полиакриламидном геле (ПААГ), поскольку растворение гелей агарозы осуществляется очень просто благодаря возможности их расплавления (см. ниже).

Растворение ПААГ в H_2O_2

Чаще всего растворение ПААГ ведут путем окисления его перекисью водорода. Если радиоактивность содержится в углероде, то во избежание потерь ее с $^{14}\text{CO}_2$ его улавливают, добавляя до 1% NH_4OH . Простейшая методика такова: диск или срез пятна из ПААГ заливают 1 мл 30%-ного раствора H_2O_2 с 1% NH_4OH , выдерживают в закрытом флаконе при 65° в течение 4—6 ч до полного растворения, а затем заливают раствор в диоксановый сцинтиллятор. Для счета радиоактивности в толуольном сцинтилляторе сначала проводят неполное растворение ПААГ в уменьшенном объеме концентрированного раствора перекиси водорода, а для окончательного растворения и подготовки к внесению в толуол используют продажные солюбилизаторы. Например, диск ПААГ кладут в угол флакона и там подсушивают в течение ночи. Затем его заливают 0,25 мл 30%-ного раствора H_2O_2 с 1% NH_4OH и держат в наклонном положении в течение 4—8 ч при 37° . Затем при комнатной температуре добавляют 1 мл солюбилизатора (NCS, Bio-Solv или Protosol) и после полного растворения — 5 мл толуольного сцинтиллятора.

Иногда вместо введения солюбилизатора при растворении ПААГ в 0,5 мл 30%-ной H_2O_2 используют 5%-ную концентрацию NH_4OH . Для предупреждения потерь радиоактивности с летучими продуктами инкубацию в течение 6 ч при 37° ведут под тонким слоем парафинового масла. Затем добавляют 4 мл Aquasol и 50 мкл ледяной CH_3COOH [Lai et al., 1979].

В случае препаратов, меченных тритием, не приходится заботиться об улавливании CO_2 . Растворение ПААГ в H_2O_2 происходит лучше после предварительной краткой обработки геля хлорной кислотой. Диск ПААГ толщиной 1—2 мм заливают 0,2 мл 60%-ной HClO_4 , затем добавляют 0,4 мл 30%-ного раствора H_2O_2 , туго завинчивают флакон и выдерживают его при 60° в течение 3—5 ч до полного растворения геля. После этого добавляют 10 мл Aquasol и через час считают. Использование концентрированной хлорной кислоты требует осторожности — она взрывоопасна.

Заметим в заключение, что небольшие потери $^{14}\text{CO}_2$ или паров $^3\text{H}_2\text{O}$ при растворении ПААГ неизбежны и могут быть неодинаковы от препарата к препарату, поэтому считать двойную метку ^{14}C и ^3H таким способом не рекомендуется.

Растворение ПААГ без H_2O_2 с помощью солюбилизаторов

Solucene при 60 — 65° с энергичным встряхиванием за сутки растворяет ПААГ полностью. Счет можно вести в толуол-тритоновом сцинтилляторе. Однако поскольку солюбилизатор одновременно растворяет и выводит из геля радиоактивный препарат, нет необходимости добиваться полного растворения самого ге-

ля — достаточно обеспечить его сильное набухание. Это и имеет место при обработке ПААГ солюбилизаторами типа NCS и Protosol. Фирма «NEN» рекомендует для обработки препаратов в ПААГ использовать прямо 3%-ный раствор Protosol в Econofluor (10 мл), т. е. раствор солюбилизатора в сцинтилляторе. За ночь при 37° гель в таком растворе набухает, и около 80% радиоактивности белка выходит из него в сцинтиллятор.

Недавно предложена смесь, содержащая 6 г ППО, 10 мл NCS и 10 мл гиамингидроксида в 1 л толуола. По утверждению автора, за 24 ч при комнатной температуре до 95% радиоактивности белка выходит из ПААГ в эту смесь [Aloyo, 1979].

Во всех этих вариантах, вынув набухший диск геля, можно считать во флаконе двойную метку, в том числе с коррекцией тушения. Однако всегда остается опасение, что наиболее высокомолекулярные белки не полностью растворились и остались в геле, нарушив тем самым пропорции белкового состава препарата и распределение радиоактивностей в нем.

Растворимый ПААГ, например сшитый NN'-диаллилтартар-диамидом, легко растворить за 2 ч при комнатной температуре в 2—4%-ном растворе ортоиодной кислоты. Раствор можно прямо вносить в толуол-тритоновый сцинтиллятор. Однако фирма «NEN» утверждает («LCS-Application Note» N28), что и в этом случае результат получается лучше, если вместо полного растворения геля элюировать из него белок в течение ночи при 37° обработкой 5%-ным раствором Protosol в Econofluor. Выход радиоактивности достигает 92%, а уровень эффективного счета для ^3H поднимается до 44%.

Гели агарозы, как уже упоминалось, перед просчетом радиоактивности можно просто расплавить. К полоске агарозы, содержащей пятно или полосу нуклеиновой кислоты, добавляют 0,5 мл 1 н HCl и нагревают до 90°. Агароза расплавляется; одновременно идет частичный кислотный гидролиз нуклеиновой кислоты, обеспечивающий ее растворимость в сцинтилляторе. Расплавленную агарозу охлаждают до 60°, добавляют 10 мл Biofluor или Aquasol-2 и хорошо перемешивают. Выход радиоактивности при этом достигает 99%, эффективность счета (для ^3H -белка) — 34—37%.

Элюция белков и нуклеиновых кислот из геля

Этот прием был подробно рассмотрен при описании методов электрофореза белков и нуклеиновых кислот [Остерман, 1981]. Здесь в качестве примеров приведем возможность элюции белков из ПААГ в 1%-ный раствор ДДС-Na с 6 М мочевиной при 37° за 40 ч [Buisson et al., 1976] и элюции ДНК в 0,5 М раствор $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, содержащий 10 мМ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 0,1% ДДС-Na и 0,1 мМ ЭДТА, при 37° за 10 ч [Maxam, Gilbert, 1977].

Что касается количественных оценок, то недостатком метода является неуверенность в полноте и отсутствии избирательности

элюции. Кроме того, трудно избежать значительного разбавления радиоактивности.

Перенос белков и нуклеиновых кислот из геля на нитроцеллюлозный фильтр или диазобумагу путем вымывания, диффузии или электрофореза был рассмотрен в части II данной книги и подробнее — при описании электрофореза. Перенесенную на такой фильтр радиоактивность можно тестировать автордиографически и просчитать, как описано выше. Иногда перенос носит почти количественный характер. Однако, как правило, приемы такого переноса используют не для определения радиоактивности, а для выделения определенных фракций препарата в целях дальнейшей обработки их на фильтре (иммунотестирования, гибридизации и др.).

Для качественных, прикидочных определений ^{14}C (но не ^3H !) можно просто высушивать тонкие диски или кусочки ПААГ на поверхности стекловолокнистого фильтра или тонкой фильтровальной бумаги (30 мин при 50° или 2 ч на воздухе) до состояния тонкой пленки и просчитывать ее, как считают осадки на фильтрах. Даже для ^3H можно таким образом получить выход радиоактивности около 10% [Leinen, Wittliff, 1978].

Для счета радиоактивности в ПААГ можно импрегнировать сцинтиллятор в гель. Как и при сушке фильтра, при этом нужно убрать воду из геля и на ее место ввести толуольный сцинтиллятор. Например, для просчета радиоактивности ^3H -РНК описана следующая последовательность операций. Трубочку геля вымачивают в течение ночи в пяти объемах 10%-ной CH_3COOH — это фиксирует полосы РНК и предохраняет гель от сжатия при последующей потере воды. Гель сканируют по УФ-поглощению и в нужных местах вырезают диски толщиной 1,1 мм. Каждый диск помещают во флакон с 5 мл абсолютного этанола и ведут дегидрирование в течение 2 ч. Затем этанол последовательно заменяют толуолом (1 ч) и 5 мл толуольного сцинтиллятора, содержащего 0,8% butyl PBD. Автор утверждает, что для трития ему удавалось достигнуть эффективности счета в 58% [Gezelius, 1977].

Следует отметить, что погоня за высокими выходом и эффективностью счета радиоактивности далеко не всегда оправдана. Зачастую радиоактивности в препарате имеется с избытком. Куда более существенную опасность могут представить собой диспропорции счета из-за неодинаковости выхода радиоактивности для разных компонентов разделенной смеси белков или нуклеиновых кислот. Методы счета радиоактивности нередко следует оценивать и выбирать именно с этой точки зрения. Разумеется, в этом отношении безупречен метод полного растворения препарата в сцинтилляторе.

Автордиография

Этим термином обозначают метод регистрации положения полос и пятен радиоактивно меченных белков, нуклеиновых кислот и их фрагментов на пластинах геля после электрофореза и

в других аналогичных случаях путем контактной «фотографии» — почернения рентгеновской пленки непосредственно под действием β -излучения. Почернение, как обычно, обнаруживается после проявления и фиксации пленки. Авторадиографию используют также для отбора клонов микроорганизмов, несущих вектор со встроенной радиоактивно меченой ДНК или выявляемых по способности их ДНК гибридизоваться с радиоактивной «пробой» (см. ниже).

Энергия β -излучения ^{32}P достаточно велика, чтобы его авторадиографию можно было вести прямо с влажной пластины геля. Оставив ПААГ для жесткости на одной из стеклянных пластин (или уложив гель агарозы на стеклянную или пластиковую подложку), его заворачивают в тонкую полиэтиленовую пленку и закладывают в кассету соответствующего размера. Затем в темноте накладывают на гель рентгеновскую пленку, мягкую прокладку и крышку кассеты с пружинящими зажимами. Кассету заворачивают в черную бумагу и в таком виде экспонируют при выбранной температуре. Для последующего совмещения пленки с гелем на нем по углам делают отметки радиоактивными чернилами. На геле эти отметки видны невооруженным глазом, а на пленке появляется их авторадиографическое изображение. В качестве радиоактивных чернил можно использовать и обычные чернила, добавив в них какое-либо высокоактивное, меченое ^{14}C соединение.

При авторадиографии соединений, меченных ^{14}C , для уменьшения поглощения β -частиц в самом геле его высушивают. Эту операцию удобно вести, уложив гель на листок толстой фильтровальной бумаги «Whatman 3MM». Гель прилипает к бумаге, не

ссыхается и, высыхая, дает прозрачную, плоскую и прочную пленку на бумаге. Бумагу кладут на пористую подложку, а ее — на перфорированную алюминиевую пластину. Сверху гель прикрывают полиэтиленовой пленкой и двумя слоями фильтровальной бумаги, а затем весь «сэндвич» помещают в полиэтиленовый мешок, который присоединяют к вакуумному насосу. Мешок можно нагревать в горячей воде или под лампой. Гель полностью высыхает за 1–2 ч. Разнообразные фирменные конструкции устроены аналогично, но вместо полиэтиленового

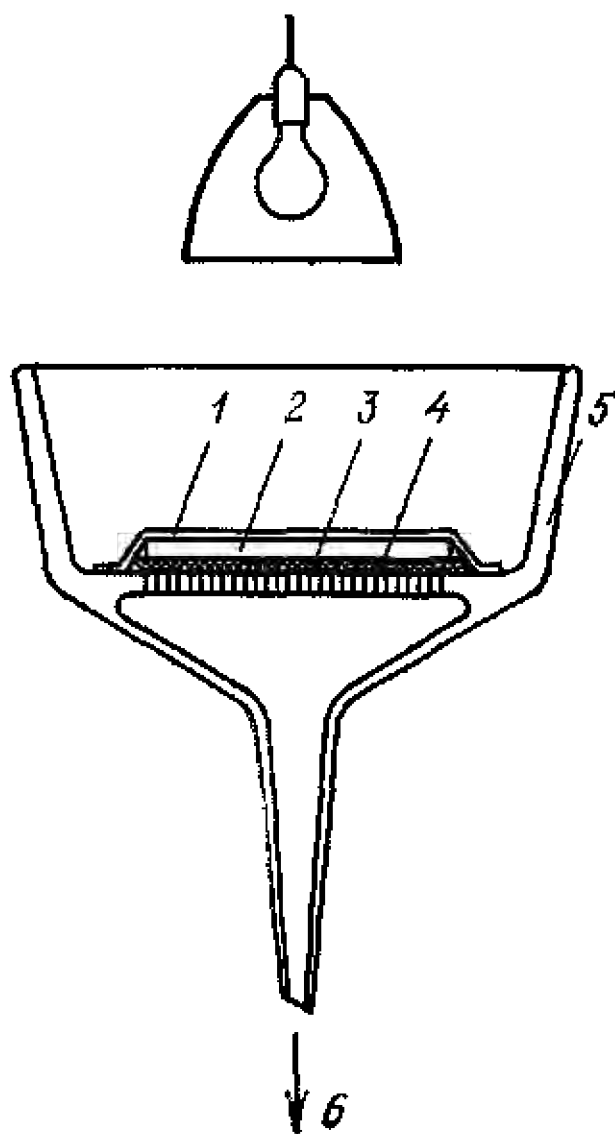


Рис. 72. Простое лабораторное устройство для сушки гелей

1 — тонкая и мягкая резина; 2 — гель; 3 — листок «Whatman 3MM»; 4 — частая латунная сетка; 5 — воронка Бюхнера; 6 — к водоструйному насосу

мешка используют жесткую конструкцию пористой подложки для геля, который сверху накрывают слоем тонкой и мягкой резины. Присасываясь вакуумом, резина облегает гель и подложку, обеспечивая необходимое уплотнение. Тот же прием иллюстрирует простое лабораторное приспособление для сушки гелей небольшого размера (рис. 72).

Во избежание растрескивания ПААГ перед высушиванием его следует подержать 30 мин в 10%-ном растворе глицерина. При сушке концентрированных ПААГ желательно подводить вакуум к обеим поверхностям геля. Для этого гель следует накрыть сверху пленкой или пластиной из пористого, но не прилипающего к гелю материала, например из пористого полиэтилена, а затем уже — слоем резины.

При работе с ^{14}C желательно использовать пластины ПААГ толщиной не более 0,4 мм. В противном случае β -частицы из нижних слоев геля, даже после его высушивания, не достигнут рентгеновской пленки. Гели толщиной 0,4 мм и меньше удобно сушить на воздухе, на листке гладкого картона, наклеенного на плексиглас. За 36 ч при комнатной температуре гель высыхает в очень гладкую пленку, что важно для хорошего прилегания к ней эмульсии. Пластинку геля из воды поднимают стеклом и дают ей соскользнуть на картон, к которому гель прочно пристает.

Высушивание гелей агарозы, которое сочетают с выжиманием из них влаги, было описано в части I.

На высушенный гель рентгеновскую пленку накладывают непосредственно. Для улучшения контакта пленки с гелем под крышку кассеты следует подложить прокладку из губчатой резины. Экспозиция при автордиографии занимает обычно от нескольких часов для ^{32}P до нескольких дней и недель для ^{14}C . Радиоактивность трития методом автордиографии, как правило, не регистрируют ввиду слишком большого поглощения слабых β -частиц ^3H на пути к рентгеновской пленке. Кратковременную экспозицию влажных гелей с ^{32}P ведут обычно при комнатной температуре, более длительную — на холоду (вплоть до -20°) для уменьшения диффузии материала в геле во время экспозиции. Вести автордиографию высушенных гелей при пониженной температуре смысла не имеет. Полезно напомнить, что при удлинении времени экспозиции размер пятна на пленке за счет β -частиц, вылетающих под малыми углами к плоскости геля, увеличивается.

Для автордиографии используют медицинские, рентгеновские, неэкранированные пленки (в пленках, защищенных инертным экраном, последний бесплодно поглощает энергию β -частиц). Фирма «Kodak» производит пленки с маркировкой «Kodak, No screen X-ray film», например типа NS-5T. Можно использовать и пленки отечественных марок РТ-1, РТ-2 и РТ-6М. Фирма «ЛКВ» рекламирует новую высокочувствительную пленку «ЛКВ-Ultrafilm». Проявление и фиксацию пленок производят по рекомендациям фирм-изготовителей.

Чтобы составить представление о чувствительности метода авторадииографии, можно указать, что пятно с плотностью радиоактивности ^{14}C в 25 000 расп./мин на 1 см^2 надежно обнаруживается этим методом за 24 ч экспозиции.

Непрямая авторадииография

Этот метод позволяет заметно повысить чувствительность регистрации малых количеств ^{32}P , но особенно существенно — γ -излучения (^{125}I). Дело в том, что при обычной авторадииографии быстрые β -частицы радиоактивного фосфора пронизывают рентгеновскую пленку, не отдав всей своей энергии. Это тем более относится к γ -лучам. В методе «непрямой авторадииографии» («indirect autoradiography») энергия покидающих пленку β -частиц или γ -излучения трансформируется в световую. Для этого описанный выше «сэндвич» дополняют еще пластинкой флюоресцирующего экрана, которую накладывают на рентгеновскую пленку по другую ее сторону от геля. Под действием β -частиц или γ -лучей на экране в местах, расположенных над пятнами и полосами радиоактивности в геле, возникает свечение, которое и регистрируется рентгеновской пленкой. Почернение рентгеновской пленки в этом случае обусловлено суперпозицией двух эффектов прямого воздействия радиации и косвенного — преобразованного в свечение экрана. Используют медицинские экраны для флюороскопии, покрытые вольфрамом кальция (CaWO_4) или фторхлоридом бария (только для ^{32}P). Эти экраны в данном случае называют интенсифицирующими. Для фотографирования с них в медицине используют высокочувствительную экранированную пленку. Ее используют и для непрямой авторадииографии, тем более что потери энергии β -частиц ^{32}P и γ -излучения в защитном экране такой пленки относительно малы. Приведем подробный перечень марок экранированных пленок, поскольку они широко используются и в описанном ниже методе флюорографии. Все они относятся к категории «Screen type X-ray film». Наиболее употребительны пленки фирмы «Kodak»: «Kodak X-Omat R», «Kodak X-Omat H», «Kodak RP-50», «Kodak XR-5X», «Kodak DX-80». Наряду с ними встречаются марки «Cronex IV film», «Fuji RX», «Agfa-Gevaert», «Cupix RP2». Фотопромышленность ГДР выпускает подходящую пленку под маркой «ORWO-HS 11». Из отечественных пленок для данных целей более всего подходит пленка РМ-1. Заодно упомянем марки интенсифицирующих экранов: «Lightning Plus Intensifying Screen» и «Quanta III Intensifying screen» (фирмы «Du-Pont»), «Fuji Mach 2 Screen» и отечественные экраны химфармзавода им. Семашко марки ЭУ-ВЗ.

По причинам, которые рассмотрены в следующем разделе, гель, пленку и экран при непрямой авторадииографии экспонируют при -70° . Разрешение близко расположенных полос и пятен при непрямой авторадииографии вообще несколько хуже, чем при

прямой. Это легко понять, если принять во внимание, что экран отделен от геля толщиной рентгеновской пленки, а траектории β -частиц и γ -излучение вовсе не обязательно перпендикулярны плоскости геля. Очень заметно ухудшается разрешение при замерзании влажного геля. В тех случаях, когда разрешение играет важную роль, гели следует высушивать или экспонировать без охлаждения, жертвуя некоторой долей чувствительности. Для повышения чувствительности пленки ее целесообразно предварительно... засветить до определенного уровня. Смысл этой неожиданной операции поясняется ниже.

Проявлять пленки фирмы «Kodak» рекомендуется в течение 5 мин при 20° в фирменном проявителе «Kodak liquid X-ray developer». Перед закреплением их надо быстро сполоснуть в 3%-ном растворе CH_3COOH . Пленку РМ-1 проявляют согласно инструкции, указанной на упаковке.

Метод не прямой автораддиографии дает выигрыш по чувствительности при регистрации ^{32}P в 8 раз, а при регистрации ^{125}I — в 30 раз. За 24 ч (при -70°) можно надежно обнаружить почернение от пятна с плотностью распределения радиоактивности ^{32}P в 50 расп./мин на 1 см^2 , а для ^{125}I — 100 расп./мин.

Флюорография

Этот метод регистрации полос и пятен в гелях и на пластинках после ТСХ близок к предыдущему в том смысле, что и здесь на пленке регистрируется свет флюоресценции, возбуждаемой за счет энергии β -частиц. Однако, в отличие от не прямой автораддиографии здесь используют не находящиеся вне геля флюоресцирующие экраны, а сцинтилляторы, введенные внутрь самого геля и находящиеся в непосредственном контакте с радиоактивными препаратами. Благодаря такому контакту поглощение энергии β -частиц в геле оказывается сведенным до минимума. Чувствительность метода столь высока, что позволяет уверенно регистрировать положение полос и пятен препаратов, меченных тритием.

Выше упоминался способ замещения воды в ПААГ на толуольный сцинтиллятор. Этот способ пригоден для счета радиоактивности, но не для регистрации положения препаратов в геле, поскольку описанные процедуры замещения приведут к размытию пятен и деформации геля. Из-за небольшого объема пластины геля можно обойтись и без растворителя, введя в нее достаточно большое количество собственно сцинтиллятора.

Флюорография пластинок после ТСХ. Такой подход был впервые использован для флюорографического определения положений пятен на пластине после ТСХ в слое целлюлозы. 15 мл 7%-ного раствора ППО в эфире быстро выливали на пластинку размером 20×20 см и, наклоняя ее, равномерно распределяли жидкость по всей поверхности сорбента. Через 3 с пластинку можно уже держать вертикально и помахивать ею до высыхания эфира. Затем, сделав пометки радиоактивными чернилами, на-

кладывали пленку, зажимали через прокладку и экспонировали при -70° . Чувствительность для ^3H позволяла регистрировать за сутки 10 000 расп./мин на 1 см^2 , т. е. оказалась выше, чем чувствительность по ^{14}C при автордиографии [K. Randerath, E. Randerath, 1971].

Равномерность распределения ППО можно улучшить, если пластинку поставить в хроматографическую камеру с 7%-ным раствором ППО в ацетоне и дать этому раствору за счет капиллярных сил подняться до конца пластины.

Выше рассмотрена возможность использовать сцинтиллятор без растворителя. Однако эффективность счета и чувствительность метода увеличиваются на порядок, если растворитель все же ввести. При опрыскивании пластинки, покрытой сухим носителем, это сделать несложно. Растворитель может быть и твердым — например, 2-метилнафталин [Bonner, Stedman, 1978], который плавится при $34,5^{\circ}$. При добавлении к нему толуола легко получить жидкую при комнатной температуре смесь, которая затвердевает при улетучивании толуола. 2-Метилнафталин, подобно нафталину, обладает способностью эффективно поглощать энергию β -излучения и передавать ее сцинтиллятору, т. е. выполнять основную функцию растворителя сцинтиллятора. Авторы опрыскивали свои пластинки 0,4%-ным раствором ППО (его высокая концентрация больше не нужна) в смеси 2-метилнафталина и толуола (9:1). Выигрыш в чувствительности по сравнению с исходным методом составил 15 раз. Для пластин ПААГ этот метод, очевидно, не пригоден.

При флюорографии белков и нуклеиновых кислот, сорбированных на нитроцеллюлозных фильтрах или диазобумаге, можно поступать еще проще — окунуть фильтр в 7%-ный раствор ППО в эфире, а затем высушить [Burckhardt, Birnstiel, 1978]. Результат получается несколько лучше, если концентрацию ППО в эфире увеличить до 10%.

Флюорография пластин ПААГ. Плодотворность использования препаратов, меченных тритием, а также стабильной двойной метки $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ заставила разработать методы флюорографии и для пластин ПААГ. Очевидно, что здесь нельзя обойтись опрыскиванием или даже вымачиванием геля в растворе сцинтиллятора. Сцинтиллятор надо принудительно ввести внутрь геля, а для этого в первую очередь следует заменить воду в объеме геля жидкостью, способной растворять ППО. В качестве такой жидкости можно использовать диметилсульфоксид (ДМСО). Важным преимуществом здесь является относительно малая деформация геля при замене воды в нем на ДМСО. Подробная процедура была предложена в 1974 г. Боннером и Ласки. Сейчас ее, по-видимому, уже можно считать устаревшей (см. ниже), но ввиду чрезвычайно широкой распространенности имеет смысл процитировать ее подробно.

По окончании электрофореза полосы и пятна препарата в геле фиксируют, например 10%-ным раствором ТХУ. Можно их

также окрасить и сфотографировать. При последующей обработке ДМСО краска расплывется, поэтому положение полос препарата лучше сразу после окрашивания зафиксировать проколами в геле.

Затем пластину ПААГ вымачивают в течение часа в двух сменах ДМСО (по 20 объемов по отношению к объему геля). Надо не забывать, что ДМСО ядовит и проходит через кожу; работать следует в перчатках! После этого гель переносят на 3 ч в четыре объема 22%-ного (вес/объем) раствора ППО в ДМСО. За это время ППО входит в гель. Но ДМСО не является сцинтилляционным растворителем, поэтому его надо убрать, но так, чтобы ППО (пусть в твердом виде) остался в геле. Высушить ДМСО трудно. Вместо этого гель вымачивают в течение часа в 20 объемах воды. ДМСО внутри геля снова заменяется на воду, а ППО не вымывается, так как выпадает в осадок. Гель быстро становится белым и непрозрачным, а его линейные размеры, несколько сократившиеся в ДМСО, восстанавливаются. Затем гель высушивают в вакууме, как описано выше. На бумажном фильтре получают прочно приставшую, жесткую и непрозрачную белую пленку, состоящую в основном из твердого сцинтиллятора, в который вкраплены полосы радиоактивного препарата. Несмотря на кажущуюся непрозрачность этой пленки, свет от вспышек сцинтилляций в ее глубине доходит до наложенной сверху рентгеновской пленки и оставляет на ней почернения в местах, расположенных непосредственно над радиоактивным материалом. Используют экранированную рентгеновскую пленку одной из указанных выше марок, экспозицию ведут при -70° .

Чувствительность метода позволяет при исходной толщине ПААГ в 1,5 мм зарегистрировать за 24 ч экспозиции радиоактивность трития в 30 000 расп./мин на 1 см^2 .

Гели, содержащие менее 2% акриламида (обычно смешанные с агарозой), могут раствориться в ДМСО. Для них лучше пользоваться 10%-ным раствором ППО в метаноле. Обработка аналогична: двукратное вымачивание геля в 20 объемах метанола и т. д. Для более концентрированных гелей метанол не пригоден — они в нем слишком сильно сжимаются [Bonner, Laskey, 1974; Laskey, Mills, 1975]. Метод Боннера и Ласки не свободен от недостатков: он трудоемок, связан с использованием токсичного растворителя и дорог из-за большого расхода ППО. В связи с этим были предприняты поиски путей его усовершенствования.

Было найдено, что ППО можно вводить внутрь геля раствором не в ДМСО, а в ледяной уксусной кислоте, что удобнее и менее опасно — кислота не так токсична и не проникает через кожу. Для флюорографии гелей агарозы ДМСО вообще непригоден, так как агароза в нем растворяется. Метанол агарозу не растворяет, но вызывает образование пузырей в геле и трещины при высушивании. Уксусная кислота свободна от этого недостатка. Кроме того, ППО в ней лучше растворим, что позволяет уве-

личить его содержание в высушенном геле и повысить тем самым чувствительность метода. Впрочем, это существенно только для ПААГ. Оказалось, что максимальная чувствительность достигается при соотношении ППО и матрицы геля, равном 2,5:1. Для гелей агарозы характерно примерно в 10 раз меньшее содержание сухого материала, чем для ПААГ, поэтому гели агарозы с концентрацией более 1,2% и толщиной более 2 мм следует просто вымачивать (временами покачивая) в растворе ППО в ледяной уксусной кислоте, концентрация которого в 2,5 раза больше, чем концентрация геля. ППО растворяется и в слегка разбавленной CH_3COOH , поэтому нет нужды предварительно переводить гель в чистую уксусную кислоту. В начале вымачивания, когда вода из геля еще не уравнилась со всем объемом кислоты, ППО частично выпадает в осадок, но потом он исчезает. Вымачивание после этого следует продолжать еще в течение часа. В общей сложности оно занимает около 3 ч. Затем гель переносят в воду еще на час, а затем сушат в вакууме при 45° , помогая высушиванию сжатием, как обычно для гелей агарозы. Флюорографию тонкой и плотной пленки высушенного геля ведут по методу Боннера и Ласки [Burckhardt et al., 1979].

Тонкие гели агарозы низкой концентрации отличаются хрупкостью. Авторы, подробно исследовавшие этот метод [Pulleyblank, Booth, 1981], предлагают для них несколько иную обработку. Сначала такой гель агарозы ($<1,2\%$ или тоньше 2 мм) высушивают в указанных выше условиях на листке «Whatmann 3ММ», затем высушенный гель вместе с этой подложкой помещают на 10 мин в воду. Гель слегка набухает и легко снимается с бумаги. Концентрация его теперь намного выше, чем в исходном состоянии. Тонкую, но прочную и гибкую пластинку гидратированной агарозы переносят на 5 мин в 15%-ный раствор ППО в ледяной уксусной кислоте, а затем еще на 5 мин — в 30%-ный. После этого для осаждения ППО достаточно подержать гель в воде 10 мин. Затем его можно сушить на любой подложке в воздухе при комнатной температуре или на фильтровальной бумаге, как обычно, в вакууме. Остальное проделывают, как описано выше.

Пластины ПААГ, также без предварительного перевода в чистую кислоту, можно вымачивать в 20%-ном растворе ППО в уксусной кислоте до растворения временного осадка и еще в течение часа. Затем их вымачивают один час в воде и сушат в вакууме при 80° .

Заметим, что во всех вариантах цитируемого метода после осаждения ППО нет необходимости тщательно отмывать уксусную кислоту водой, так как, в отличие от ДМСО, кислота хорошо улетает при сушке. Гели агарозы мало изменяют свои размеры в органических растворителях. ПААГ в уксусной кислоте несколько набухает (в ДМСО — сжимается), и это еще увеличивает возможность введения ППО. Удобство использования CH_3COOH состоит еще и в том, что она не нарушает окраски

полос красителем типа СВВ. Перед флюорографией белковые полосы следует прокрасить. Чувствительность метода от этого не страдает, так как краситель поглощает свет в красной области и пропускает голубую сцинтилляцию ППО.

Далее было найдено, что в качестве твердого сцинтиллятора вместо ППО можно использовать салицилат натрия. Максимум флюоресценции этого ароматического соединения лежит при 409 нм, что вполне приемлемо для регистрации на пленку. Кроме дешевизны, важным преимуществом салицилата натрия является его растворимость в воде — отпадает необходимость в замене воды в геле на органический растворитель. Рекомендуемая методика подготовки геля к флюорографии крайне проста. Пластины ПААГ вымачивают в 10 объемах 1 М водного раствора салицилата натрия в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого ее кладут на листок «Whatman 3ММ», сушат в вакууме, а затем ведут флюорографию по методу Боннера и Ласки. Чувствительность получается не хуже, а полосы немного более диффузные, чем при использовании ППО. Белки в геле можно предварительно фиксировать и окрашивать.

Раствор салицилата натрия хранится 1—2 недели, а потом приобретает коричневатую окраску (по-видимому, окисляется). Для хранения можно осадить салициловую кислоту добавлением эквимольного количества HCl, осадок промыть на фильтре и высушить в течение ночи с отсосом. Салицилат натрия умеренно токсичен, но также проникает через кожу, так что работу следует вести в перчатках [Chamberlain, 1979].

Повышение чувствительности рентгеновской пленки путем ее предварительного засвечивания. Это неожиданное явление находит себе объяснение в механизме релаксации фотопроцесса. Общеизвестно, что существо этого процесса состоит в восстановлении под действием света ионов бромистого серебра до атомов серебра, что и обнаруживается при проявлении в виде почернения. На первом этапе процесса образование атомов серебра вызывает деструкцию кристаллической решетки AgBr и соответствующие напряжения в ней. Эти напряжения стремятся вернуть атом серебра в решетку кристалла, разумеется, снова в виде иона. Такая «релаксация» кристаллической решетки ведет к потере скрытого изображения. Именно с целью замедления релаксации и следует вести флюорографическое экспонирование, особенно малой радиоактивности, при -70° . И все же, если каждый кристаллик AgBr получает в среднем менее одного фотона в секунду, «стирание» изображения за счет релаксации становится достаточно вероятным процессом. Такая частота попадания фотонов как раз отвечает случаю регистрации малой радиоактивности слабого β -излучателя.

Между тем, если до релаксации в кристаллике AgBr успеет образоваться второй атом серебра, то искажение решетки оказывается столь сильным, что релаксация вообще не происходит. Предварительное, дозированное и равномерное освещение плен-

ки как раз и «заряжает» все кристаллики AgBr первым атомом серебра. Разумеется, это приводит к появлению на пленке некоего фона («вуали»), но зато даже при слабом β -облучении атомы серебра будут накапливаться — релаксация и потеря изображения будут более или менее блокированы [Laskey, Mills, 1975].

Подбор условий предварительного освещения пленки ведут эмпирически. Оптимум лежит обычно в области, которой отвечает образование вуали с плотностью $A_{540}=0,2\div 0,3$ (после проявления). Освещать пленку следует не ранее чем за час до использования, и с этого момента ее держат все время при -70° . Пленку кладут освещенной стороной к гелю. В качестве ориентиров можно указать следующие условия предварительного засвечивания пленки: освещение фотовспышкой «Kodak» через оранжевый фильтр «Wratten» № 22 или 21, прикрытый листом «Whatman № 1», с расстояния в 70 см или освещение фотовспышкой отечественного производства типа СЭФ-2 или СЭФ-3 с расстояния 1 м.

Количественное определение радиоактивности

После флюорографии, если необходимо произвести количественное определение, полосы из геля можно вырезать, дать им набухнуть в минимальном количестве воды и далее солюбилизировать и просчитывать находящийся в них биологический материал, как было описано выше. При оценке эффективности счета в жидком сцинтилляторе надо учесть увеличение содержания в нем ППО или салицилата натрия, выходящих из геля; иными словами, следует принять во внимание изменение состава сцинтиллятора. Это заставляет пользоваться только методом внутренней стандартизации (см. выше).

Регистрация двойной метки (^3H и ^{14}C) в ПААГ

Высокая чувствительность метода флюорографии позволяет в сочетании с автордиографией производить сортировку пятен или полос в ПААГ по содержанию в них двух долгоживущих изотопов — ^3H и ^{14}C . Таким образом можно обнаружить различия в составе двух сложных белковых смесей, например генетических вариантов. Белки одной смеси метят ^3H , а второй — ^{14}C . Обе смеси объединяют и подвергают двумерному фракционированию в ПААГ по методу О'Фаррелла (см. часть I). Пластинку можно высушить, импрегнировать сцинтиллятором и путем флюорографии зарегистрировать суммарную радиоактивность ($^3\text{H}+^{14}\text{C}$) на пленку «Kodak XR-5». С негатива удобно сделать контактный отпечаток — пятна радиоактивности будут белыми на темном поле. С того же высушенного геля путем автордиографии на пленке «Kodak NS-5T» при комнатной температуре регистрируют практически только ^{14}C . Накладывают вторую пленку на первую. Не закрытые черным белые пятна указывают белки, меченные

только ^3H , т. е. принадлежащие только к одной из двух белковых смесей. Затем изотопные метки этих смесей можно поменять местами [McConkey, 1979].

Для более четкого отделения радиоактивности углерода можно сначала высушить гель и провести автордиографию, а уже затем замочить его снова в воде, импрегнировать сцинтиллятором и провести флюорографию $^3\text{H}+^{14}\text{C}$ [Kuhn, Wilt, 1980]. Некоторые сложности здесь могут быть связаны с необходимостью повторного высушивания геля до прежних размеров.

Сканирование пластинок торцевыми счетчиками

Сканирование радиоактивных пятен торцевыми счетчиками на пластинках после ТСХ и бумаге после хроматографии или электрофореза одно время практиковалось широко, а затем было вытеснено намного более чувствительными методами счета в жидких сцинтилляторах. Однако фирме «Berthold» (ФРГ) удалось в такой степени усовершенствовать сканирующую аппаратуру и чувствительность торцевых газопоточных счетчиков, что метод вновь стал конкурентоспособным по чувствительности, а по своей экономичности и скорости он имеет явное преимущество перед использованием жидкостных сцинтилляционных счетчиков для этой цели. Чувствительность метода возросла в такой мере, что его можно успешно использовать и для сканирования высушенных пластин после электрофореза в ПААГ.

Сканирующий прибор. Модель «Berthold DC-II» (LB 2723) оснащена торцевым газопоточным счетчиком, работающим на дешевых газах (метане, этане, пропане), с легко сменными, открытыми или закрытыми тонким окошком диафрагмами. Анод из проволоки находится под напряжением до 3000 В. Сильное электрическое поле втягивает β -частицы через щель диафрагмы внутрь счетчика. Пластины укладывают на столе размером 20×40 см. Их можно сканировать с различными фиксированными скоростями — от 12 до 30 000 мм/ч. Расстояние между строчками можно регулировать в пределах от 0,1 до 10 мм. На втором, параллельно перемещающемся столе на бумаге записываются пики интенсивности радиоактивного излучения либо печатаются точки, плотность расположения которых пропорциональна радиоактивности на соответствующем участке пластинки. Во втором режиме получается картина расположения пятен, подобная автордиографической, а в первом можно получить количественные оценки радиоактивности. Эти оценки, разумеется, носят относительный характер, так как не учитывают выхода радиоактивности из пластинок. Значения этого выхода для пластинок после ТСХ в зависимости от материала и толщины слоя носителя составляют 0,7—3% для ^3H и 15—30% для ^{14}C . Это немного по сравнению с приводившимися выше значениями выхода радиоактивности из порошков при счете в жидком сцинтилляторе, но не уступает выходу радиоактивности при флюорографии.

За 24 ч сканирования на малой скорости прибор может зарегистрировать все пятна радиоактивности с плотностью порядка 10 000 расп./мин на 1 см² для ³H и 1000 — для ¹⁴C. Высокие активности, в частности пятна ³²P, регистрируются очень быстро. Сопоставление приведенных данных по чувствительности прибора с данными для флюорографии пластинок после ТСХ показывает, что в этом плане оба метода эквивалентны, но при использовании прибора фирмы «Berthold» отпадает необходимость не только в импрегнировании сцинтиллятора в тонкий слой или гель, но и в расходовании времени и средств на фоторегистрацию. Впрочем, в случае сложной картины с большим количеством пятен (метод О'Фаррелла), по-видимому, разрешающая способность флюорографии будет выше.

Линейный анализатор «Berthold LB 2832». В этом приборе достижения методов исследования элементарных частиц в ядерной физике умело использованы для анализа распределения радиоактивности в тонком слое после фракционирования биологических молекул. Если описанное выше сканирующее устройство «читает» каждую «строку» путем перемещения вдоль нее диафрагмы торцевого счетчика (очень медленного при малой радиоактивности — для накопления счета), то в этом приборе вся строка лежит под открытым окном счетчика размером 25 × 1,5 см. Вдоль его оси натянута регистрирующая импульсы проволока анода. Остроумное использование двух электронных «линий задержки» позволило конструкторам прибора «поручить» этой проволоке регистрацию не только амплитуды импульса радиоактивности, как в обычных газопоточных счетчиках, но и *местоположения* испускания этого импульса вдоль длины проволоки. В принципе — без технических деталей — это достигается сопоставлением времен распространения электрического импульса от места его непосредственного возникновения до концов проволоки — времен, пропорционально увеличенных до наносекундного уровня с помощью линий задержки.

Таким образом, оставаясь неподвижным при «чтении» каждой «строки», прибор одновременно ведет регистрацию всех радиоактивных участков, попадающих на эту строку. Это приводит к увеличению скорости регистрации радиоактивности при заданной чувствительности или (что эквивалентно) к увеличению чувствительности при заданной продолжительности регистрации — примерно в 100 раз. Так, 250 расп./мин трития или 50 расп./мин углерода в одном пятне могут быть зарегистрированы за 20 мин! Конструкция прибора позволяет получить разрешение в 0,5 мм для полос и пятен трития и 1 мм — для ¹⁴C. Программу счета всей пластинки (выбора строк) и математической обработки результатов измерений, в том числе и сопоставления распределения радиоактивностей в разных треках, можно задать комплектующему прибору счетно-командному устройству («Data System 3500») с выводом результатов в виде графиков и таблиц на телевизионный экран.

Фотографирование радиоактивных пятен с пластинок в искровой камере «Berthold LB 292». Это устройство также базируется на методах, используемых в физике элементарных частиц. Пластинку после ТСХ или гель после электрофореза (высушенный или нет — в зависимости от уровня и характера радиоактивности) помещают на дно темной камеры, заполненной разреженным газом. Анод в виде частой и тонкой вольфрамовой позолоченной сетки располагается над пластинкой. Каждая β -частица, вылетающая из любого радиоактивного пятна, ускоряется электрическим полем в направлении, перпендикулярном плоскости пластины, возбуждает газовый разряд и дает вспышку света, локализованную над местом вылета частицы из пятна. Эта вспышка фотографируется на поляроидную пленку. Из совокупности вспышек быстро формируются контуры всех пятен, тем более ярких (светлых на темном фоне), чем выше их радиоактивность.

Чувствительность метода колоссальна: 250 расп./мин ^3H или 50 расп./мин ^{14}C в пятне диаметром 0,5 см можно зарегистрировать за 20 мин. Однако резкость границ пятен за счет случайного распределения первоначальных направлений вылета β -частиц хуже, чем при флюорографии. Разрешающая способность — примерно 1 мм. В тех случаях, когда требуется быстро локализовать на пластинке или в пленке геля не слишком близко расположенные друг к другу пятна радиоактивности, метод дает колоссальный выигрыш в скорости и чувствительности их обнаружения. Специальное устройство проектирует полученную фотографию снова на пластинку, так что радиоактивные пятна на ней можно обвести, а затем вырезать для подсчета в жидком сцинтилляторе.

С помощью искровой камеры можно наблюдать и распределение радиоактивности в срезах тканей и органов.

РЕГИСТРАЦИЯ РАДИОАКТИВНОСТИ В ПРОТЕКАЮЩЕЙ ЖИДКОСТИ

Эффективность методов такой регистрации невелика, поэтому в большинстве случаев экспериментаторы предпочитают просчитывать в жидком сцинтилляторе аликвоты из хроматографических фракций.

Для непрерывной регистрации радиоактивности элюата с колонки употребляют два подхода. Первый заключается в том, что жидкость пропускают через U-образную трубку, устанавливаемую в счетчик на месте флакона, между двумя ФЭУ и заполненную мелкими бусами из твердого сцинтиллятора. Сцинтилляции от β -излучения возникают только на поверхности бусинок, поэтому эффективность счета составляет всего лишь примерно 0,6% по ^3H и около 25% по ^{14}C .

Второй подход к решению проблемы, по существу, соответствует обычной практике счета аликвот в жидком сцинтилляторе.

Часть элюата автоматически отбирается, смешивается с жидким сцинтиллятором и пропускается через тефлоновую трубочку, введенную опять-таки в жидкостной счетчик радиоактивности на место флакона с препаратом. Эффективность счета в такой системе может быть столь же высокой, как при обычном счете радиоактивности в жидком сцинтилляторе. Чувствительность метода определяется долей элюата, которой экспериментатор готов пожертвовать.

Предлагаемый для этой цели прибор той же фирмы «Berthold LB 503» пригоден, в частности, для работы с жидкостными хроматографами высокого давления.

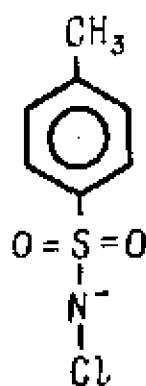
Глава 3

ВВЕДЕНИЕ РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКИ В БЕЛКИ

ИОДИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ХЛОРАМИНА Т

Радиоактивный иод довольно легко включается в белок по остаткам тирозина с образованием иодтирозина или дииодтирозина. Для замещения протона в бензольном кольце тирозина путем электрофильной атаки нужен катион I^+ . Радиоактивный же иод поступает в виде иодида натрия $Na^{125}I$, где иод является анионом, поэтому катализаторами реакции иодирования тирозина служат окислители, способные отобрать у аниона иода два электрона и превратить его в катион, т. е. осуществить переход $I^- \rightarrow I^+$.

Одним из таких катализаторов служит N-хлортолуолсульфамид натрия, получивший торговое название «Хлорамина Т». В его молекуле азот, присоединив электрон, стал двухвалентным и подобным кислороду в «стремлении» заполнить наружную электронную оболочку.



Хлорамин Т

В инкубационную смесь объемом 10—40 мкл можно ввести до 10 мкг белка, примерно десятикратное по массе количество Хлорамина Т и 0,1—1 мКи радиоактивного иода в виде $Na^{125}I$. Последний поставляется в виде раствора в 0,1 М NaOH, поэтому его следует нейтрализовать кислотой до pH 7,5 — оптимального для иодирования с помощью Хлорамина Т. Препараты без носителя (УА $\approx$ 17 Ки/мг) выпускаются с концентрацией 100 мКи/мл и более 350 мКи/мл. Обычно вполне достаточно первой концентрации.

Можно рекомендовать следующие исходные растворы для проведения реакции иодирования: $Na^{125}I$ — 100 мКи/мл; 0,25 М Na-фосфатный буфер, pH 7,5; Хлорамин Т — 5 мг/мл в 0,05 М

Na-фосфатном буфере, pH 7,5; белок — 0,2—0,5 мг/мл в том же буфере; тиосульфат натрия — 1,2 мг/мл в том же буфере; NaI или KI — 2 мг/мл в том же буфере с 2% сыворотки лошади. Все растворы должны быть свежеприготовленными.

Последовательность операций при иодировании белка такова: в полистироловую пробирку размером 70×12 мм вносят по 10 мкл раствора Na^{125}I и Na-фосфатного буфера, а затем быстро, с непрерывным перемешиванием (с помощью микромагнитика) добавляют по 10 мкл растворов белка и Хлорамина Т.

Реакция иодирования идет практически мгновенно. Между тем, Na^{125}I (из-за интенсивной радиации и возможных примесей) и Хлорамин Т (как сильный окислитель) представляют опасность для нативности белка, поэтому контакт белка с ними должен быть сведен к минимуму. Вслед за Хлорамином Т в пробирку добавляют 100 мкл раствора тиосульфата натрия. Этот сильный восстановитель нацело блокирует оставшуюся окислительную способность Хлорамина Т. Затем реакционную смесь дополняют до 1 мл раствором NaI или KI. Назначение этой операции — конкурентное вытеснение ^{125}I из мест его неспецифической сорбции.

Исходную радиоактивность смеси просчитывают в γ -счетчике. Затем проводят отделение меченого белка от радиоактивного иода гель-фильтрацией на колонке Сефадекса G-25 (0,9×12 см). Для насыщения центров сорбции через колонку предварительно пропускают 0,5 мл раствора (100 мг/мл) бычьего сывороточного альбумина. Элюцию белка ведут тем же 0,05 М Na-фосфатным буфером. Включение в белок лучше рассчитывать по разности исходного счета и суммарного счета низкомолекулярной части элюата. Тем самым исключаются потери счета белка в результате его неспецифической сорбции на посуде и сефадексе. Для вычисления удельной активности белка по его исходному количеству это может быть существенным. Счет радиоактивности в γ -счетчике ведут каждый раз в объеме 1 мл. Иногда для уменьшения сорбции белка реакцию иодирования проводят в присутствии 0,1% ДДС-Na [Bray, Brownlee, 1973].

Недавно был предложен быстрый способ очистки белка от ^{125}I путем центрифугирования «мини-колонки» G-25, изготовленной из конической полипропиленовой пробирки емкостью 1,5 мл, проколотовой на конце. При внесении в такую колонку 0,1 мл белкового раствора и центрифугировании внутри второй пластиковой пробирки (200 g; 1 мин) белок полностью выходит из колонки, а свободный ^{125}I в ней на 99% задерживается [Tuszynski et al., 1980].

Все работы по иодированию белка следует вести под тягой из-за выделения в воздух паров радиоактивного иода.

Имеет смысл использовать для реакции Na^{125}I без носителя, для того чтобы максимально снизить молярное отношение иод/тирозин. Этим обеспечивается получение в качестве продукта реакции только моноиодтирозина, что позволяет с большей сте-

пенью определенности проводить дальнейший анализ белка, например хроматографическое разделение пептидов.

Как уже упоминалось, при иодировании с помощью Хлорамина Т есть опасность окисления белка. В частности, остатки метионина могут окисляться до его сульфоксидов, что будет мешать получению BrCN-пептидов, а остатки цистеина в результате окисления могут образовывать избыточные дисульфидные мостики, так что белок может оказаться инактивированным. Ввиду этого SH-группы белка перед иодированием иногда тем или иным способом химически блокируют. Например, к раствору, содержащему 4—10 мг/мл белка в 0,02 М боратном буфере (pH 8) с 1% ДДС-Na и 10 мМ ЭДТА, добавляют 0,01% β-меркаптоэтанола и до 10 мМ 2-оксиэтилдисульфита. Смесь выдерживают 5 мин при 100°. Все свободные SH-группы при этом блокируются оксиэтилдисульфитом. Непрореагировавший дисульфит и меркаптоэтанол улетают. Белок (с подогревом) растворяют в воде и проводят реакцию иодирования с Хлорамином Т [Davison, 1976].

Иодирование белков после их фракционирования электрофорезом можно производить прямо в геле путем вымачивания его в соответствующих растворах Na¹²⁵I, Хлорамина Т и тиосульфата натрия и последующих отмывок невключившихся предшественников. Это позволяет детектировать методом непрямой автораддиографии не обнаруживаемые иными способами белковые полосы [Christopher et al., 1978]. Разумеется, расход изотопа и Хлорамина Т при этом очень велик.

Если же белковые полосы после электрофореза в геле можно обнаружить обычной окраской, а введение радиоактивного иода используется только для последующего пептидного анализа, то поступают более экономно. Белковые полосы из геля вырезают. Один такой диск вымачивают в 0,3 мл 0,5 М Na-фосфатного буфера, содержащего 0,5 мКи Na¹²⁵I, и добавляют туда 5 мкл раствора Хлорамина Т, чтобы получить его концентрацию 0,1 мг/мл. Через 2 мин при 25° добавляют еще одну такую же порцию Хлорамина Т, а через 1 мин — еще одну. Затем реакцию останавливают добавлением 0,1 мл насыщенного водного раствора тирозина. Остальной ¹²⁵I присоединяется к нему и может быть удален диализом. Меченный таким образом белок можно гидролизовать, например трипсином, прямо в геле, а затем элюировать из него радиоактивно меченные пептиды белка, содержащегося в выбранной полосе геля [Bryant et al., 1979].

Отметим, что с помощью Хлорамина Т можно иодировать Тритон X-100. Его алкилфенол похож на тирозин. Меченый Тритон X-100 может представить интерес для исследования связывания его с белком и других реакций с участием этого широко используемого детергента [Fischetti et al., 1976].

В конце 1981 г. фирма «Pierce» сообщила о выпуске в продажу Хлорамина Т, иммобилизованного на носителе. На поверхности гранул полистирола закреплено большое число молекул Хлорамина Т, сохраняющего свои окислительные свойства. Для

введения ^{125}I в белок эти гранулы перемешивают с остальными компонентами реакционной смеси. Прекращают реакцию декантацией раствора. Торговое название материала — «Iodo-Beads».

Другой вариант аналогичного подхода, т. е. введение водонерастворимого окислителя взамен раствора Хлорамина Т, можно осуществить с помощью реагента, поставляемого той же фирмой под названием «Iodo-Gen». Он представляет собой предложенный еще в 1978 г. 1,3,4,6-тетрахлор-3а,6а-дифенилгликоурил [Fraker, Speck, 1978]. Реактив растворим в хлороформе и хлористом метиле, откуда его можно в виде пленки нанести на стенки пробирки. В воде он не растворим и играет роль твердого окислителя, ведущего иодирование белка. Для прекращения реакции раствор просто выливают из пробирки. Эффективность иодирования намного выше, чем у Хлорамина Т. Еще более существенно явное преимущество этого реагента в отношении мягкости воздействия и сохранения активности ферментов. Так, лизоцим в присутствии Хлорамина Т или N-хлорсукцинимидом полностью инактивируется и выпадает в осадок, а при иодировании с помощью Iodo-Gen его активность не снижается.

ИОДИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ H_2O_2 И ЛАКТОПЕРОКСИДАЗЫ

В этом методе, как и в предыдущем, производится иодирование тирозинов белка за счет Na^{125}I , но вместо сильного химического окислителя используется ферментная система. Преимущество такого подхода состоит в том, что белок не находится в контакте с сильным окислителем. Иногда в этом направлении идут еще дальше и, чтобы избежать контакта белка с перекисью водорода, вводят две сопряженные ферментные системы: глюкоза и глюкозооксидаза образуют H_2O_2 за счет воды и окисления глюкозы, а затем уже лактопероксидаза использует образующуюся перекись водорода для окисления иода.

Ниже описан простейший вариант процедуры иодирования [Bolton, 1977].

Исходные растворы: Na^{125}I — 100 мКи/мл; 0,4 М CH_3COONa , pH 5,6; лактопероксидаза — 2,5 мкг/мл в 0,1 М CH_3COONa , pH 5,6 (готовят из замороженного для хранения препарата с концентрацией 10 мг/мл непосредственно перед использованием); свежеприготовленный раствор H_2O_2 (20 мкг/мл) в деионизованной воде; тирозин — 2 мг/мл в 0,05 М Na-фосфатном буфере, pH 7,5; NaI или KI — 2 мг/мл в том же буфере с 0,2% желатина; иодируемый белок — 0,2—0,5 мг/мл в 0,05 М Na-фосфатном буфере, pH 7,5. При хранении белка азид использовать не следует — он ингибирует лактопероксидазу.

В полистирольную пробирку вносят 10 мкл исходного раствора Na^{125}I (1 мКи) и 20 мкл 0,4 М CH_3COONa , pH 5,6. Непрерывно перемешивая, добавляют последовательно 10 мкл раствора белка (2—5 мкг), 10 мкл раствора лактопероксидазы

(0,025 мкг) и 10 мкл раствора H_2O_2 (0,2 мкг). Инкубируют 7 мин при комнатной температуре и добавляют еще 10 мкл раствора H_2O_2 . Спустя 7 мин вносят еще раз 10 мкл H_2O_2 . Еще через 7 мин останавливают иодирование белка внесением 0,5 мл раствора тирозина (1 мг). Через минуту для подавления неспецифической сорбции ^{125}I и радиоактивного иодтирозина на белке дополняют смесь до 1 мл раствором NaI или KI , содержащим желатину.

После этого определяют исходную γ -радиоактивность (все последующие просчеты радиоактивности ведут в том же объеме и в таких же пробирках). Очистку иодированного белка от невключенной радиоактивности проводят путем гель-фильтрации, как было описано для иодирования с Хлорамином Т. Подсчет радиоактивности, включенной в белок, проводят так же по разности исходной суммарной и низкомолекулярной (после сефадекса) радиоактивностей.

При работе с ферментной системой, а тем более с двумя ферментами, не следует забывать, что одновременно с исследуемым белком иодируются и сами ферменты. Нередко из этого вытекает необходимость их последующего хроматографического отделения от основного белка [La Porte, Storm, 1978].

Введение ^{125}I с помощью H_2O_2 и лактопероксидазы в суммарные клеточные белки можно осуществить непосредственно в культуре клеток, без их предварительного разрушения. Фермент и H_2O_2 проходят через клеточную мембрану [Horst, Roberts, 1979].

Необходимость отделения ферментов от исследуемого белка после окончания иодирования, естественно, поставила вопрос о возможности использования иммобилизованных ферментов для этой цели. Лактопероксидаза легко присоединяется BrCN -активированной сефарозой, сохраняя свою ферментативную активность. На 1 мл влажной сефарозы можно «посадить» до 2,3 мг фермента [David, Reisfeld, 1974]. Перед использованием иммобилизованную лактопероксидазу каждый раз промывают для удаления фермента, который мог сняться с обменника во время хранения. В реакционную смесь на 10 мкг белка достаточно внести 10 мкл влажной сефарозы с лактопероксидазой и H_2O_2 в концентрации 0,1 мМ. В присутствии 10^7 имп./мин Na^{125}I и 10 мкМ KI реакцию иодирования ДНК-связывающего белка слюворотки человека, например, вели в течение часа при комнатной температуре [Parsons, Kowal, 1979]. Останавливали ее добавлением азидата натрия — до 0,04%. Затем сефарозу с лактопероксидазой осаждали центрифугированием (2000 g; 15 мин). Очистку от невключенного в белок ^{125}I проводили путем гель-фильтрации.

Недавно фирма «Bio-Rad» выпустила под названием «Enzymobeads» гранулы гидрофильного носителя, на которых попеременно иммобилизованы два фермента: глюкозооксидаза и лактопероксидаза. К раствору белка в нейтральном буфере для его иодирования добавляют суспензию «Enzymobeads», Na^{125}I и глюкозу (см. «Bio-Rad Technical Bulletin N 1071 E, July 1979»).

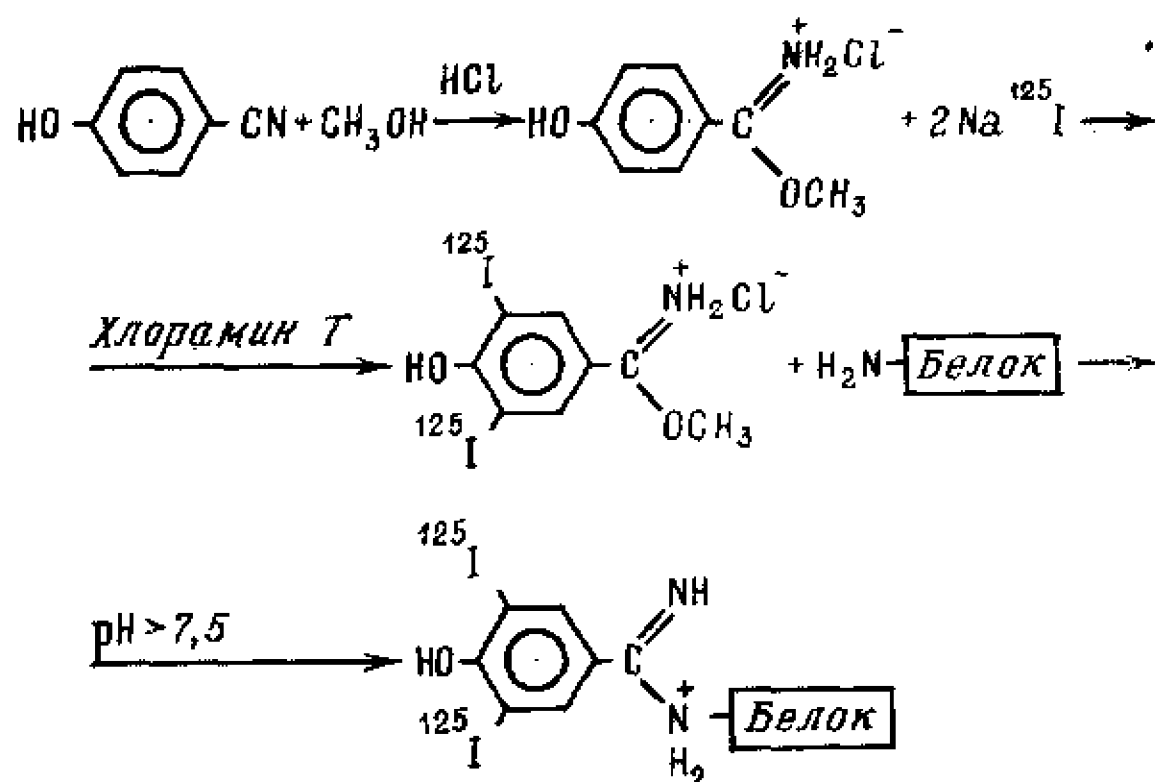
Все же и при ферментативном окислении иода не удается полностью избежать опасности окисления и денатурации белка, поэтому в последние годы все большую популярность приобретает радиоактивная метка белка путем присоединения к нему иодированных реагентов.

ПРИСОЕДИНЕНИЕ СПЕЦИАЛЬНЫХ ИОДИРОВАННЫХ РЕАГЕНТОВ

С помощью Хлорамина Т за счет Na^{125}I в 0,1 н. HCl при 0° можно иодировать анилин. Затем действием нитрита натрия аминогруппу анилина можно заменить на diaзониевую группу, по которой иодированное производное анилина в щелочной среде присоединяется к белку. Меченный таким образом белок легко очистить гель-фильтрацией [Hayes, Goldstein, 1975].

Одновременно было описано использование метил-*n*-оксибензимидаата в качестве промежуточного реагента, который можно иодировать, а затем присоединить к белку. Иодирование осуществляется также с помощью Хлорамина Т, а присоединение к белку происходит по аминогруппам за счет отщепления метилового эфира реагента. Примечательно, что при этом сохраняется положительный заряд белка.

Однако следует отметить, что при нейтральных и щелочных значениях pH фенольная OH -группа в соседстве с двумя иодами легко диссоциирует (pK_a снижается до 6,5), что приводит к появлению дополнительного отрицательного заряда. Впрочем, то же самое имеет место и в диодитирозине. Если это существенно, условия иодирования надо подбирать таким образом, чтобы включать только один атом ^{125}I на молекулу. В качестве исходного материала в описываемой реакции можно взять продажный *n*-оксибензонитрил и обработать его безводным метанолом в присутствии HCl :



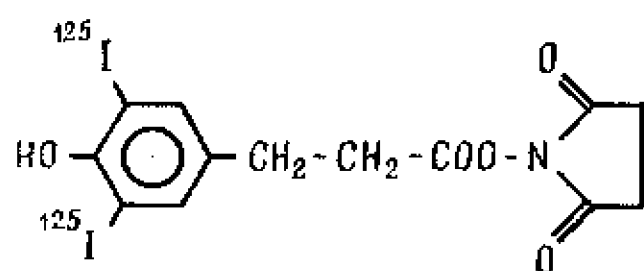
Меченный иодом реагент (III) хорошо хранится при -20° . Введение метки в белок не связано с наличием в нем тирозина,

что позволяет получить высокое значение УА. Вуд и соавторы [Wood et al., 1975] таким образом иодировали белок до уровня 10^7 имп./мин на 1 мг.

Предложенный этими авторами реагент в настоящее время выпускается фирмой «Amersham» в готовом виде с УА >4000 Ки/ммоль под названием «метил-3,5-ди[^{125}I]иодоксибензимидаата» (МИОБИ). Процедура введения метки в иммуноглобулин с его помощью была недавно подробно описана — удалось получить УА до 10^9 имп./мин на 1 мг иммуноглобулина. Иодирование идет достаточно медленно — в течение 100 ч инкубации при комнатной температуре включение метки в белок все еще нарастает. При 37° продолжительность иодирования можно ограничить 33 ч [Der-Balian, 1980].

Впрочем, Толан и соавторы отмечают, что иодированный бензимидаат труднее реагирует с белком, чем неиодированный метил-*n*-оксибензимидаат (МРНВИ — препарат фирмы «Pierce»). По их данным, уровень включения ^{125}I оказывается существенно выше, если иодирование вести после присоединения МРНВИ к белку (лишенному тирозина). Так метили по ^{125}I рибосомные белки после их фракционирования электрофорезом в ПААГ. Белки извлекали из геля с помощью 1%-ного раствора ДДС-Na. В комплексе с детергентом их обрабатывали МРНВИ (при 65° , 15 мин), от избытка бензимидаата освобождали переосаждением комплекса ацетатом калия, а затем иодировали. В качестве окислителя использовали упомянутый выше «Iodo-Gen». Его осаждали на стенку пробирки из раствора в хлороформе. Авторы отмечают, что выбор стекла влияет на успешность иодирования. С боросиликатным стеклом результаты получаются хуже, чем с натриевым [Tolan et al., 1980].

Реактив Болтона—Хантера («Bolton—Hunter Reagent»), разработанный для этой же цели еще в 1973 г. [Bolton, Hunter, 1973], получил в настоящее время очень широкое распространение. Это — эфир *N*-оксисукцинимида и иодированной (^{125}I) *n*-оксифенилпропионовой кислоты. Фирма «NEN» поставляет его еженедельно с УА = 1500 Ки/ммоль (однозамещенный по ^{125}I) и УА = 4000 Ки/ммоль (двухзамещенный) в виде бензольных растворов. Его можно получить и в лабораторных условиях на основе продажного препарата *N*-сукцинимидил-3-(4-оксифенил)-пропионата («NSHPP», фирма «Calbiochem») по следующей прописи [Bolton, 1977].



Реактив Болтона-Хантера

Исходные реактивы: NSHPP — 40 мкг/мл в смеси толуол—этилацетат (1:1); Na^{125}I — 100 мКи/мл; Хлорами́н Т — 5 мг/мл

в 0,25 М Na-фосфатном буфере, рН 7,5; тиосульфат натрия — 12 мг/мл в 0,05 М Na-фосфатном буфере (последние два реактива должны быть свежеприготовленными); NaI и KI — 200 мг/мл; диметилформамид (ДМФ) и бензол. Все органические растворители должны быть безводными, перед использованием их следует перегнать.

В коническую стеклянную пробирку на 10 мл с притертой пробкой вносят 10 мкл раствора NSHPP. Растворитель выпаривают в вакууме или струе сухого азота. В пробирку кладут магнитик и при перемешивании быстро добавляют друг за другом 20 мкл Na^{125}I , 10 мкл Хлорамина Т, 10 мкл тиосульфата натрия, 10 мкл NaI или KI, затем 2 мкл ДМФ и 250 мкл бензола. Закрыв пробку, пробирку осторожно встряхивают («Vortex») для экстракции образующегося реактива Болтона—Хантера в бензол. Бензольную фазу переносят в коническую пробирку, а водную экстрагируют еще 2 раза по 250 мкл бензола. Экстракты объединяют и измеряют γ -радиоактивность. Все операции можно уложить в 20 с. Бензол упаривают в вакууме или сухом азоте, стенки пробирки промывают бензолом и снова упаривают.

Планируя реакцию иодирования белка с помощью реактива Болтона — Хантера, надо иметь в виду, что в воде он легко разлагается, отщепляя N-оксисукцинимид. Время полураспада при рН 8,5 составляет всего 9 мин. В мягких условиях реактив присоединяет метку пептидной связью в основном по концевым аминок группам белка. До сих пор для иодирования белка успешно используют первоначальную методику [Bolton, Hunter, 1973].

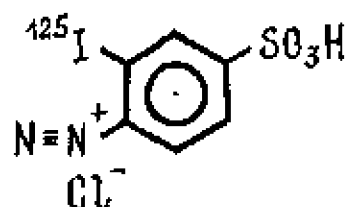
5 мкг белка в 10 мкл 0,1 М боратного буфера (рН 8,5) вносят в пробирку, где находится 0,2 мкг реактива Болтона—Хантера, высушенного из соответствующей аликвоты его раствора в бензоле, хорошо перемешивают и держат 15 мин при 0°. При этом белок иодируется на 100%, а из внесенной радиоактивности на это расходуется около одной трети метки. Для связывания непрореагировавшего реактива добавляют 0,5 мл 0,2 М раствора глицина и держат еще 5 мин при 0°. Для предотвращения сорбции белка на сефадексе смесь дополняют до 1 мл 0,25%-ным раствором желатины в 0,05 М Na-фосфатном буфере, рН 7,5. После счета исходной γ -радиоактивности следует описанная выше очистка белка на колонке сефадекса. После предварительного пропускания через колонку бычьего сывороточного альбумина следует тщательно отмыть от него сефадекс тем же раствором желатины (на альбумине легко сорбируется радиоактивный продукт распада реактива). Белковые фракции для стабилизации белка лучше собирать в пробирки с внесенной туда сывороткой. В итоге можно получить белок с $\text{UA} = 10^{10}$ имп./мин на 1 мг.

Отметим, что в результате присоединения реактива Болтона—Хантера заряд полипептида уменьшается по крайней мере на единицу (если не считать возможной диссоциации фенильной ОН-группы). В случае иодирования относительно коротких

пептидов это обстоятельство можно использовать для отделения меченых пептидов от немеченных и от радиоактивных предшественников с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге [Coutts, Reid, 1978].

Важное, а иногда и решающее значение при выборе метода иодирования белка имеет вопрос о сохранении его биологической активности. Болтон и Хантер в упомянутой работе 1973 г. продемонстрировали сохранение иммунореактивности многих белков после обработки предложенным ими реактивом. Недавно было тщательно обследовано влияние метода иодирования на биологические свойства кальмодулина. Оказалось, что иодирование с Хлорамином Т приводит к его полной инактивации, лактопероксидазный метод угнетает активность белка весьма существенно, а иодирование с помощью реактива Болтона—Хантера полностью сохраняет его биологическую активность [Chafouleas et al., 1979].

Фирма «NEN» разработала и продает меченный по ^{125}I реактив, предназначенный для иодирования только поверхностных белков клеточной мембраны, поскольку он не проникает внутрь клетки. Это диазопроизводное иодсульфаниловой кислоты имеет фирменное название «Iodosulfanilic acid, [^{125}I]-Labeling Kit»;



его формула изображена выше. Отметим также препарат, сочетающий радиоактивную метку ^{125}I с флуоресценцией,— [^{125}I]-дидиодфлуоресцеинизотиоцианат. Он мягко взаимодействует с белками и поверхностями клеток, позволяя сочетать методы регистрации радиоактивности с флуоресцентным детектированием и микроскопией. Описаны его синтез, очистка и использование [Gabel, Shapiro, 1978].

ИОДИРОВАНИЕ ЗА СЧЕТ Na^{125}I В ПРИСУТСТВИИ ICl

Конечный результат этой реакции тот же — иодирование белка по остаткам тирозина. Радиоактивный иод также вводится в виде Na^{125}I (или Na^{131}I), но вместо принудительного окисления аниона иода до катиона последний вводят в инкубационную смесь одновременно с Na^{125}I в виде нерадиоактивного хлористого иода (ICl). Радиоактивный и нерадиоактивный иод равноправны в этих двух соединениях, поэтому между ними мгновенно происходит обмен, в результате чего в растворе в равновесной концентрации появляется ^{125}ICl , т. е. необходимый для иодирования тирозина катион радиоактивного иода ($^{125}\text{I}^+$).

Хлористый иод представляет собой стабильный продажный

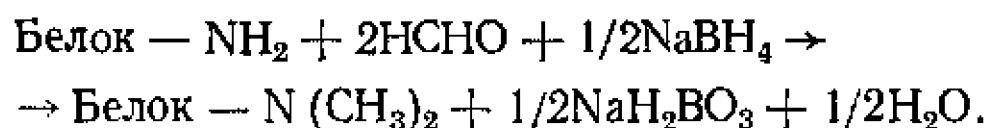
реактив. Кроме того, его легко получить обработкой водного раствора KI в смеси с KIO₃ концентрированной соляной кислотой.

Na¹²⁵I и ICl добавляют к раствору белка эквимольно, в четырехкратном молярном избытке по отношению к белку. Белок растворяют в 0,2 М боратном буфере (pH 8), Na¹²⁵I вносят в том же буфере, а затем при быстром перемешивании добавляют раствор ICl в 0,1 М HCl с 0,15 М NaCl в объеме, равном примерно 0,1 объема смеси. Иодирование белка заканчивается за 1 мин. Затем для восстановления свободного Na¹²⁵I добавляют избыток тиосульфата натрия. Очевидно, что в этом случае нельзя избежать включения в белок 50% «холодных» атомов иода, однако с учетом высокой УА исходных препаратов Na¹²⁵I такое разбавление радиоактивности приемлемо и даже окупается простотой метода. Очистку белка от предшественников можно вести обычным способом.

Этим можно закончить обзор способов введения радиоактивного иода в белки *in vitro*. Напомним, что они позволяют получить высокорadioактивные, но короткоживущие препараты меченого белка. Наиболее широко эти приемы применяются в радиоиммунохимических методах исследования (см. ниже).

ВВЕДЕНИЕ ¹⁴C И ³H

Чаще других с этой целью используют боргидрид натрия. Введение радиоактивности происходит в ходе реакции метилирования свободных аминогрупп белка по следующей схеме:



Из схемы реакции видно, что ¹⁴C можно этим методом ввести в белок только за счет ¹⁴C-формальдегида, а тритий может исходно находиться как в формальдегиде, так и в боргидриде натрия. Надо иметь в виду, что NaBH₄ в водной среде легко разлагается. Процесс этот несколько замедляется при щелочных значениях pH, но даже при pH 9 и комнатной температуре время полураспада составляет примерно 10 мин, а при pH 8 — около 1 мин, поэтому NaBH₄ обычно хранят в сухом виде, в вакуум-эксикаторе над осушителем и растворяют навеску непосредственно перед использованием. Из-за незначительности обычно используемых количеств боргидрида такая практика связана с большими потерями. Недавно было отмечено, что раствор NaBH₄ в 0,1 М NaOH можно хранить при —70° в течение нескольких недель без заметного разрушения препарата [Kuhn, Wilt, 1980].

Реакцию метилирования ведут в слегка щелочном буфере, а боргидрид берут в значительном избытке.

В качестве типичного примера условий рассматриваемой реакции можно процитировать довольно давнюю, но в этом пла-

не не устаревшую работу [Rice, Means, 1971]. Авторы использовали [^{14}C]-НСНО с УА-10 мКи/моль. Продажный препарат в виде 3%-ного раствора ($\sim 1\text{ M}$) разбавляли водой до концентрации 40 мМ. Маточный раствор NaBH_4 с концентрацией 5 мг/мл в 0,2 М боратном буфере (рН 9) готовили непосредственно перед опытом. 0,1 мг белка растворяли в 0,1 мл того же буфера. Можно подсчитать, что это соответствует концентрации лизина в белковом растворе примерно 0,6—1 мМ. К раствору белка добавляли 10 мкл раствора [^{14}C]-НСНО (до концентрации 4 мМ), затем при 0° (во льду) с интервалами $\sim 30\text{ с}$ 4 раза вносили по 2 мл раствора NaBH_4 (двукратный избыток по сравнению с НСНО). Через 1 мин для гарантии использования [^{14}C]-НСНО вносили еще 10 мкл раствора NaBH_4 и очищали белок от всех низкомолекулярных компонентов реакции гель-фильтрацией на сефадексе G-25.

Этим способом удалось включить около 20% от максимального уровня радиоактивности, который мог быть достигнут при диметилировании каждой аминокруппы. При исходной УА формальдегида 10 мКм/ммоль это дает примерно 5×10^6 имп./мин на 1 мг белка. Это в тысячу раз меньше того, что можно получить иодированием, но зато метка сохраняется неизменной неограниченно долго. Уровень включения можно повысить в 4—5 раз за счет использования НСНО с большей удельной радиоактивностью.

Следует отметить, что метилирование аминокрупп лизина изменяет их рК примерно на 0,5 единицы. Это может не сказаться на физико-химических свойствах белка, но его ферментативную активность следует проверять.

В качестве восстановителя вместо боргидрида иногда используют цианоборгидрид натрия (NaBH_3CN). Введение метки идет столь же успешно, но NaBH_3CN выгодно отличается устойчивостью в водной среде — реакцию можно вести при рН 7, что может оказаться весьма существенным для некоторых нестойких белков [Dottavio-Martin, Ravel, 1978]. При исследовании этой реакции было отмечено, что ей сопутствует образование цианидов, связывающих часть формальдегида, поэтому формальдегид надо брать с большим избытком. При желании цианиды можно блокировать введением в инкубационную смесь 10 мМ NiCl_2 . Никель, как и другие переходные металлы, образует координационные комплексы с цианидами [Jentoft, Deaborn, 1980].

Введение трития в белок выгоднее вести из боргидрида, чем из НСНО, поскольку боргидриды выпускаются с высокой УА (5—15 Ки/ммоль). В качестве примера приведем условия реакции в одной из недавних работ [Kumarasamy, Symons, 1979].

Исходным радиоактивным материалом служил [^3H]-КВН $_4$ с УА=13 Ки/ммоль. 100 мКи этого препарата ($\sim 0,4\text{ мг}$) растворяли в 100 мкл 0,1 М КОН, разливали по 5 мкл (5 мКи), высушивали в вакуум-эксикаторе и хранили в нем над сухим NaOH .

Перед использованием одну порцию растворяли в 30 мкл 0,01 М КОН. Нерадиоактивный формальдегид использовали в виде 20 мМ исходного раствора. 5 мкг белка (3—5 нмоль лизина) растворяли при 0° в 50 мкл 0,2 М боратного буфера (рН 9), добавляли 3 мкл раствора НСНО (60 нмоль) и через 30 с — 1 мкл раствора [³Н]-КВН₄ (~170 мкКи, 13 нмоль). Из-за выделения радиоактивного ³Н₂ работали под тягой!

Таким образом, в смеси обеспечивался примерно трехкратный избыток боргидрида по отношению к лизину и почти пятикратный избыток НСНО по отношению к радиоактивному боргидриду. Последнее необходимо для полноты использования радиоактивного предшественника — в предыдущей прописи с радиоактивным НСНО соотношение было обратным. Реакцию вели в течение 20 мин при 0°, с явным запасом времени. Затем для восстановления избытка НСНО добавляли 2 мкл нерадиоактивного 0,01 М NaBH₄ и еще через 20 мин — 0,2 мл 0,4 М Na-фосфатного буфера с 0,1 М глицина. Глицин предназначался для полного израсходования радиоактивного предшественника (метилирование глицина по концевой NH₂-группе).

Для очистки от невключенной радиоактивности из-за малого количества меченого белка использовали его соосаждение с 50 мкг БСА в 15%-ном растворе ТХУ. Осадок промывали 4 раза по 3 мл при 0° смесью эфир—ацетон (3:1). Было получено включение порядка $3,5 \times 10^8$ имп./мин на 1 мг белка, т. е. выше, чем при иодировании Хлорамином Т или лактопероксидазой.

Любопытно сравнить эффективность включения изотопа в этом и предыдущем случаях и тем самым оценить значение указанной вариации соотношения реагентов. С учетом разбавления БСА при соосаждении УА модифицированного белка должна составлять примерно $3,5 \times 10^9$ имп./мин на 1 мг, т. е. в 700 раз выше, чем в предыдущем примере. Если принять во внимание, что эффективность счета трития примерно вдвое меньше, чем углерода, то соотношение истинных включенных радиоактивностей составит примерно 1400:1. Это как раз отвечает различию удельных (молярных) радиоактивностей исходных препаратов (1300:1). Таким образом, эффективность реакции метилирования изменилась мало — видимо, она не слишком «капризна» в отношении пропорций реагентов, если избыток участвующих в метилировании компонентов обеспечен.

Очистке белка от радиоактивного предшественника путем осаждения ТХУ было отдано предпочтение и в недавней работе Куна и Вилта. Хотя авторы работали с вдесятеро бóльшим количеством белков хроматина (и осаждали их без носителя), но, по их данным, эти белки особенно склонны сорбироваться на сефадексе [Kuhn, Wilt, 1980].

Описанным методом удобно вводить метку в пептиды белкового гидролизата для их последующего картирования, например в двумерной системе ТСХ-электрофорез на пластинах, покрытых целлюлозой. Преимущество по сравнению с введением

¹²⁵I состоит в том, что заведомо метится каждый пептид, хотя бы по концевой аминокгруппе. 20 мкг гидролизата белка растворяют в 10 мкл воды, добавляют 5 мкл 10 мМ раствора NaBH₄ (меченного по ³H, если необходимо) в 1 мМ NaOH, потом 5 раз с интервалом 5 мин вносят по 2 мкл 10 мМ раствора HCHO (меченного по ¹⁴C, если необходимо) в 12%-ном водном метаноле. Это обеспечивает пятикратный избыток HCHO по отношению к числу свободных аминокгрупп и двукратный избыток NaBH₄ по отношению к HCHO. Затем добавляют 10 мкл «холодного» 0,1 М NaBH₄ для превращения избытка формальдегида в метанол, который испаряется при нанесении на ТСХ. Наконец, вносят 10 мкл 0,5 М HCl для разрушения избытка NaBH₄ и через 30 мин аликвоты по 2—10 мкг меченных пептидов наносят на пластинку для ТСХ [Nelles, Vamburg, 1979]. Заметим, что здесь NaBH₄ вносят раньше HCHO, для того чтобы предупредить возможность алкилирования других боковых групп пептидов.

Следует добавить, что описанная реакция введения метки путем метилирования успешно идет в присутствии 1% ДДС-Na и что в нуклеиновые кислоты метка не включается.

Описано включение метки в белки из [³H]-NaBH₄ в безводном диметилформамиде (ДМФА). Хотя результатом реакции и здесь является метилирование остатков лизина, но формальдегид в ней не участвует. По-видимому, промежуточным продуктом реакции служит восстановленный ДМФА, который затем, отщепляя диметиламин, присоединяется по ε-NH₂-группе лизина. Время полураспада боргидрида в ДМФА при нейтральном рН — около 1 ч. Метод удобен для введения метки в водонерастворимые белки соединительных тканей, например в срез кости, когда необходимо обеспечить проникновение боргидрида внутрь структуры за счет диффузии [Cheung et al., 1981].

Для введения стабильной метки ³H в поверхностные белки интактной клеточной мембраны используют меченный тритием триметиламин-β-аланиновый эфир N-оксисукцинимида. Этот реагент, подобно иодсульфаниловой кислоте (см. выше), не проникает внутрь клетки. Отщепляя активирующий сукцинимид, он присоединяет [³H]-триметиламин-β-аланин пептидной связью к аминокгруппам поверхностных белков мембраны [Zisapel, Littauer, 1978].

Недавно были описаны такие условия введения метки из [³H]-NaBH₄ в белки выделенных мембран эритроцитов, при которых они сохраняют способность осуществлять активный перенос через мембрану Ca²⁺ и глицина и, вместе с тем, оказываются достаточно хорошо мечеными для проведения их анализа двумерным электрофорезом по методу О'Фаррелла [Jones, Vidaver, 1981].

Итак, из всех рассмотренных химических методов введения радиоактивной метки в белки удобнее всего, эффективнее и безопаснее с точки зрения сохранения активности белка исполь-

зовать реактив Болтона—Хантера для введения ^{125}I . Если же нужна долговременная метка ^{14}C или ^3H , то следует воспользоваться метилированием белка по концевым аминок группам и остаткам лизина с помощью формальдегида и боргидрида.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ

Введение радиоактивной метки в белок ферментативным путем удается осуществить в тех случаях, когда он способен фосфорилироваться с помощью соответствующей (чаще всего цАМФ-зависимой) протеинкиназы. Донором радиоактивного фосфора служит $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$, который поставляется с УА до 5000 Ки/ммоль. Метод используется не для получения меченого белка, а для исследования самого фосфорилирования. Например, с его помощью недавно было показано, что на один моль суммарного препарата гистонов включается 0,33 моль ^{32}P , в то время как для гистона H1 включение достигает уровня 0,85 моль [Knight, Skala, 1979].

Очень широко используют радиоактивность при изучении бесклеточного синтеза белка *in vitro*. Этот исследовательский метод лишь с большой натяжкой можно отнести к числу способов получения радиоактивно меченных белков, поэтому ограничимся лишь его общей характеристикой и самыми необходимыми ссылками.

Система бесклеточного синтеза белка *in vitro* включает в себя полисомы, мРНК, полный комплекс транспортных РНК, необходимые соли, АТФ, ГТФ, систему регенерации АТФ (например, креатинфосфат и креатинфосфокиназу) и, наконец, аминокислоты — обычно 19 немеченных и одну радиоактивно меченную. Чаще всего в качестве таковой используют $[\text{S}^{35}]\text{-метионин}$ с УА ≈ 500 Ки/ммоль или $[\text{H}^3]\text{-лейцин}$ с УА > 190 Ки/ммоль. Разумеется, можно вводить метку и через другие меченные аминокислоты или их смесь. В продаже имеются готовые смеси всех радиоактивных (^{14}C или ^3H) аминокислот в пропорциях суммарного белка хлореллы. Анализ меченых полипептидов осуществляют методами электрофореза или ИЭФ с последующей флюорографией.

Если полисомы ведут трансляцию эндогенных мРНК, вместе с которыми они были выделены, то синтезируются белки, характерные для клеток-доноров этой системы. Однако сами полисомы, как и тРНК, не отличаются высокой специфичностью и могут транслировать экзогенные мРНК, вносимые в инкубационную смесь отдельно от полисом. Эндогенные мРНК в этом случае предварительно разрушают умеренной обработкой фракции полисом микрококковой нуклеазой, так что рибосомальные РНК от этого не страдают. Трансляция экзогенных мРНК *in vitro* позволяет идентифицировать их специфичность.

Было отработано и получило признание несколько систем белкового синтеза *in vitro* с использованием разных источников

полисом и тРНК, например из зародышей пшеницы, асцита Кребса и ооцитов лягушки. В последние годы ввиду высокой эффективности трансляции, дающей полноразмерные белки, и низкого уровня фонового синтеза (без экзогенной мРНК) широкое распространение получила система бесклеточного синтеза белка на основе лизата ретикулоцитов [Pelham, Jackson, 1976]. Фирма «NEN» поставляет все компоненты этой системы, включая уже обработанный нуклеазой лизат ретикулоцитов, в виде готовых наборов («Translation Kit») с [^{35}S]-метионином или [^3H]-лейцином. Недавно была описана еще одна, по утверждению ее авторов весьма совершенная система бесклеточного синтеза белка *in vitro* на основе культуры клеток яичников китайского хомячка [Fischer, Moldave, 1981].

Следует иметь в виду, что в продажных препаратах [^{35}S]-метионина имеется некая неидентифицированная примесь, которая неэнзиматически связывается с любым белком. В случае низкого уровня белкового синтеза *in vitro*, идущего в присутствии большого количества постороннего белка (гомогенат), это может привести к заметной ошибке. Дитиотреитол и β -меркаптоэтанол ослабляют описанный эффект. Примеси можно извлечь из препарата [^{35}S]-метионина прединкубацией с балластным белком и последующей очисткой от него [Suissa, 1981].

Глава 4

ВВЕДЕНИЕ РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКИ В НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Метилирование за счет меченого диметилсульфата

Диметилсульфат $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$ (ДМС) выпускается меченым как по углероду (УА до 50 мКи/ммоль), так и по тритию (УА до 5 Ки/ммоль). Он представляет собой жидкость, которая поставляется в заплавленных ампулах. Метка включается за счет метилирования остатков гуанина по N_7 и аденина по N_3 . Реакция очень неприхотлива. Например, к раствору, содержащему 1 мг ДНК в 0,2 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера, добавляли 1 мКи (25 мкмоль) [^3H]-ДМС и выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем избыток ДМС удаляли диализом против того же буфера [Bearden, 1980].

Включение ^3H из тритиевой воды с помощью метабисульфита натрия

Под действием метабисульфита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) цитозин в составе нуклеиновой кислоты превращается в урацил. При этом из водной среды присоединяется протон. Внося в реакцию

смесь тритиевую воду, можно тем самым ввести в нуклеиновую кислоту тритиевую метку [Scheinker, 1976].

К достоинствам метода можно отнести дешевизну и высокую удельную активность исходного препарата ($^3\text{H}_2\text{O}$), а также легкость его последующего удаления гель-фильтрацией и упариванием. Кроме того, в реакцию гораздо «охотнее» вступают остатки цитозина, не участвующие в образовании водородных связей, следовательно, уровень включения для однонитевых ДНК на порядок выше, чем для двуниевых. Это открывает возможности исследования вторичной структуры нуклеиновых кислот. Недостаток метода — изменение химического состава нуклеиновой кислоты в результате замены некоторых остатков цитозина на урацил. Уровень такой замены и вытекающие из него последствия (например, для матричной функции ДНК) должны учитываться.

Медленный изотопный обмен водорода

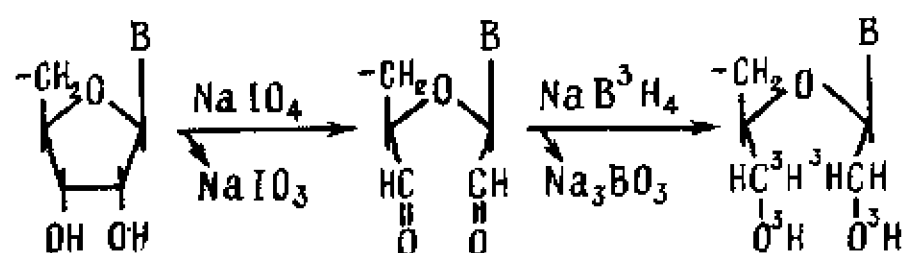
Еще в 1966 г. нами было обнаружено, что атомы водорода при C_8 пуринов в тритиевой воде могут медленно замещаться на тритий без участия катализаторов. Скорость обмена очень сильно зависит от температуры: при 90° обменное равновесие достигается менее чем за час, а при 55° время полубмена составляет 10 сут. Меченные таким образом препараты нуклеиновых кислот в виде замороженных водных растворов могут храниться неограниченно долго. При обычных для биологических реакций условиях (37° , несколько часов) обратным обменом трития в водной среде можно пренебрегать. Метод чрезвычайно прост и дешев — он сводится к растворению нуклеиновой кислоты в тритиевой воде и прогреву. Полнота обмена (уровень включения ^3H) и в этом случае зависит от вторичной структуры нуклеиновой кислоты. Используя $^3\text{H}_2\text{O}$ с УА 1—3 Ки/мл, легко получить включение метки на уровне 10^7 имп./мин на 1 мг НК [Остерман и др., 1966].

Приведем пример из недавней работы. 25 мг тРНК^{Вал} растворяли в 1 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера с 0,1 мМ ЭДТА, лиофилизировали и снова растворяли в 1 мл $^3\text{H}_2\text{O}$ (1—5 Ки/мл). Ампулу с раствором запаивали и прогревали 30 мин при 90° . Тритиевую воду удаляли лиофилизацией, а быстро обменивающиеся водороды аминогрупп и гидроксильных групп освобождали от трития тремя перерастворениями в воде и лиофилизациями. В зависимости от УА тритиевой воды получали включение от 1,6 до 8 тыс. имп./мин на 1 мкг тРНК [Repaud et al., 1979].

Введение ^3H на 3'-конец олигонуклеотида (метод Рандерата)

В этом методе, получившем широкое распространение, используется двустадийная реакция. Сначала концевая рибоза на 3'-ОН-конце олигонуклеотида раскрывается периодатным окис-

лением, а затем получающийся диальдегид восстанавливается до диольного производного с помощью ^3H -боргидрида натрия:



Особенно часто и плодотворно метод Рандерата используют при расшифровке первичной структуры РНК для обнаружения и идентификации пятен олигонуклеотидов после двумерного фракционирования гидролизатов методом ТСХ.

Например, три оптические единицы (A_{260}) фрагментов тРНК растворяли в 100 мкл 7 мМ NaIO_4 и выдерживали при комнатной температуре, в темноте, в течение 4 ч. Затем добавляли 60 мкл 1 М К-фосфатного буфера (рН 6,8), 90 мкл свежеприготовленного 0,1 М раствора $[^3\text{H}]$ -КВН $_4$ в 0,1 М КОН и 290 мкл H_2O . Инкубацию в темноте при комнатной температуре продолжали еще 4—5 ч. Избыток боргидрида разрушали добавлением 35 мкл 5 М CH_3COOH . Препарат высушивали в токе воздуха, растворяли в 2 мл воды, очищали на колонке ДЭАЭ-целлюлозы (0,7×5 см), уравновешенной 0,05 М триэтиламмонийбикарбонатным буфером, рН 8,5 (элюция тем же буфером в концентрации 2 М), и обессоливали гель-фильтрацией. Включение составило 5 мкКи ^3H [Chen, Roe, 1978].

С учетом исходной УА боргидрида (0,7 Ки/ммоль) и полагая среднюю молекулярную массу фрагментов тРНК равной 12 000, можно подсчитать, что такому включению отвечает введение метки в каждый из 3'-концевых нуклеозидов фрагментов тРНК. Интересно подсчитать также и количественные соотношения компонентов реакции в цитируемой работе. Три единицы A_{260} составляют около 120 мкг, т. е. порядка 0,01 ммоль фрагментов (с $M \approx 12\,000$). NaIO_4 было взято 0,7 ммоль, т. е. с 70-кратным превышением, а $[^3\text{H}]$ -КВН $_4$ — 9 ммоль, т. е. с 900-кратным превышением по отношению к молярному содержанию фрагментов тРНК. 175 ммоль CH_3COOH составляет 20-кратный избыток по отношению к КВН $_4$. Большие величины избытков говорят о том, что точное следование прописи авторов отнюдь не обязательно.

С другой стороны, комбинация буфера рН 6,8 (конечная концентрация $\sim 0,11$ М) с КОН (конечная концентрация $\sim 0,016$ М) дает рН $\approx 7,5$. Вести реакцию с участием боргидрида при таком рН невыгодно ввиду его распада, однако для тРНК это необходимо во избежание восстановления в щелочной среде дигидроуридина с разрывом его кольца (с гидролизатами обычных РНК реакцию можно вести при рН 9). Если вспомнить, что время полураспада боргидрида при рН 8 составляет 1 мин, то даже для 900-кратного его избытка инкубация в течение 4—5 ч не кажется оправданной.

Приведенные расчеты иллюстрируют целесообразность критической оценки публикуемых экспериментальных процедур, если даже не с целью их усовершенствования, то хотя бы для оценки необходимости строго им следовать.

Недавно Рандерат предложил новый препарат для сверхчувствительного метода радиационного обнаружения окисленных периодатом нуклеозидов и других карбонильных соединений (любых альдегидов и кетонов) — 3 ([3-¹²⁵I]-иод-4-оксифенил)пропионилкарбогидразид. Он получается замещением остатка N-оксисукцинимид в реактиве Болтона—Хантера на остаток карбогидразида. Концевая группа последнего легко связывается с диальдегидом окисленной рибозы или иным карбонилом. Препарат может быть получен с УА 2000 Ки/ммоль; он более стоек, чем боргидрид [Randerath, 1981].

Комплекс денатурированной ДНК с меченой N-метоксиаминокислотой

N-метоксипроизводное любой продажной радиоактивно меченой аминокислоты можно получить обработкой ее 2%-ным раствором формальдегида. Инкубация N-метоксиаминокислоты с денатурированной ДНК в течение 16—20 ч при комнатной температуре приводит к образованию комплекса между ними, достаточно устойчивого, чтобы выдержать промывку на мембранном фильтре 0,1 М NaCl и 5%-ной ТХУ [Sklovovksaja et al., 1978].

Иодирование нуклеиновых кислот

Как и для белков, в качестве радиоактивного предшественника в этом случае используют Na ¹²⁵I без носителя. Иод присоединяется к кольцу пиримидинов в положение С₅. Связь с цитозином заметно прочнее, чем с урацилом, поэтому для стабилизации удельной активности препарата имеет смысл после иодирования иод с урацила снять. Для этого достаточно умеренно прогреть препарат — 20 мин при 50—60°. Присоединение иода идет по тому же, что и ранее, механизму электрофильной атаки катиона ¹²⁵I⁺. Для окисления аниона ¹²⁵I⁻ до катиона можно и здесь воспользоваться Хлорамином Т.

Например, от 10 до 100 мкг суммарной РНК печени крысы растворяли в 25 мкл 0,05 М Na-фосфатного буфера (рН 7,4). В равном объеме того же буфера вносили 1,5 мКи Na¹²⁵I (УА ≈ 10 Ки/мг) и 0,1 мг Хлорамина Т и встряхивали 20 с при комнатной температуре. Для остановки реакции и предупреждения сорбции ¹²⁵I добавляли, как и для белков, 0,1 мл 5 мМ раствора тиосульфата натрия и 0,2 мл 0,1 М KI. Препарат очищали от невключившейся радиоактивности гель-фильтрацией на сефадексе G-25. Уровень включения составил примерно 7×10¹⁰ расп./мин на 1 мг РНК [Shaposhnikov et al., 1976].

Часто в качестве катализатора реакции используют треххлористый таллий (TlCl₃). Его растворяют непосредственно

перед использованием. Реакцию ведут при pH 5. При $\text{pH} \geq 6$ включение резко падает — до 8% от исходного при pH 5. Метка из $\text{Na } ^{125}\text{I}$ гораздо труднее включается в двунитевые структуры нуклеиновых кислот, чем в однонитевые [Scherberg, Refetoff, 1974].

В качестве недавнего примера приведем методику введения метки по ^{125}I в однонитевую ДНК [Leibovitch et al., 1979].

8—15 мкг однонитевой ДНК и 0,5 мКи $\text{Na } ^{125}\text{I}$ (без носителя) растворяли в 80 мкл 0,1 М CH_3COONa с 0,04 М CH_3COOH , 17,5 мкМ KCl и 0,15 мМ TiCl_3 . Реакцию вели при 60° в течение 15 мин. Затем для связывания непрореагировавшего иода в инкубационную смесь добавляли 5 мкл 0,01 М раствора тирозина и 10 мкл 2,8 М Na -фосфатного буфера (pH 6,8). Для разрушения нестойких промежуточных соединений смесь держали еще 15 мин при 60° , затем охлаждали и очищали на колонке сефадекса G-50 ($40 \times 1,6$ см). ДНК из раствора в 0,5 М NaCl переосаждали этанолом. Уровень включения составил 5×10^9 имп./мин на 1 мг ДНК. Аналогично проводили включение ^{125}I в РНК хлоропластов [Hartley, 1979].

В качестве катализатора иногда используют треххлористый торий [Segni et al., 1979].

В заключение следует отметить, что все способы введения метки в нуклеиновые кислоты, кроме медленного водородного обмена, связаны с определенными химическими модификациями этих биополимеров. Учитывая строго детерминированную химическим составом матричную функцию большинства НК, такие модификации должны, как правило, приводить к нарушениям этой функции (в отличие от белков, где даже у ферментов есть «балластные» участки полипептидной цепи). В связи с этим для введения метки в НК *in vitro* в последние годы повсеместное распространение приобрели ферментативные методы, позволяющие включать ^{32}P из нуклеозидтрифосфатов и нуклеозиддифосфатов с очень высокой УА.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ

В составе остатка фосфорной кислоты фосфор входит в каждое нуклеотидное звено ДНК и РНК. Его замещение на радиоактивный изотоп ^{32}P позволяет ввести очень высокую радиоактивность в каждую молекулу НК. Часто нет необходимости замещать все атомы фосфора, даже наоборот — бывает важно знать локализацию метки (секвенирование НК). В этих случаях ограничиваются замещением или присоединением одного атома ^{32}P на один из концов полинуклеотида. Разные ферментативные реакции используются для введения метки на 5'- или 3'-конец молекулы полимера. С этих реакций мы и начнем рассмотрение, а затем познакомимся с ферментной системой, позволяющей заменить все или почти все атомы фосфора в полимере на их радиоактивные изотопы.

Как обычно, для ферментативных реакции подбор оптимальных условий, вообще говоря, должен производиться для каждого нового типа нуклеиновой кислоты и новой партии фермента или радиоактивных предшественников. Тем не менее, можно в целях ориентировки привести для всех рассмотренных ниже реакций более или менее типичные их условия. Кроме того, целесообразно включить в прописи реакций краткие сведения о самих ферментах и условиях их хранения. Для простоты рубрикации в заголовки соответствующих разделов будут вынесены только названия ферментов.

Т4-полинуклеотидкиназа

Фермент выделяют из клеток *E. coli*, зараженных фагом Т4. С его помощью можно осуществить включение ^{32}P на 5'-ОН-конец ДНК или РНК из $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$. Поскольку описываемый метод часто используется для введения метки в продукты гидролиза НК, уже имеющие на 5'-концах фосфаты, уместно начать с необходимой в этом случае подготовительной реакции удаления концевых фосфатов. Для этого обычно используют щелочную фосфатазу из *E. coli*. Краткие сведения о ферменте: $M \approx 80\,000$ (димер); имеется два изофермента; нуждается в Zn^{2+} и Mg^{2+} ; $pI=4,5$; $pH_{\text{опт}}=8$; удельная активность 30—40 ед./мг; 1 ед. обеспечивает гидролиз 1 мкмоль *p*-нитрофенилфосфата с образованием окрашенного *p*-нитрофенола за 1 мин при 25° и pH 8. Хранят фермент в 0,01 М Трис-НСl (pH 8) с 0,12 М NaCl и 50% глицерина при —20°.

3 мкг фрагментов ДНК и 0,24 ед. щелочной фосфатазы инкубируют в 10—20 мкл 0,1 М Трис-НСl (pH 8) с 0,1% ДДС-Na при 37° в течение часа (необходимое количество Zn^{2+} и Mg^{2+} содержится в самом препарате фермента). Реакцию останавливают разбавлением до 0,2 мл 0,01 М Трис-НСl (pH 7,4) с 0,1 М NaCl и 1 мМ ЭДТА, а фермент удаляют путем фенольной депротеинизации (встряхивают с 0,2 мл фенола, насыщенного тем же буфером, и фенольный слой дополнительно экстрагируют 0,1 мл буфера). Водную фазу четырежды промывают эфиром. Дефосфорилированные фрагменты ДНК осаждают этанолом (3 ч при —70° и центрифугирование при 10 000 об./мин, 20 мин). Осадок перерастворяют в 0,2 М CH_3CCONa и снова осаждают тремя объемами этанола, сушат и растворяют в 20 мкл H_2O [Shinagawa, Radmanabhan, 1979]. Фенольной экстракции можно избежать, если есть возможность воспользоваться щелочной фосфатазой, иммобилизованной на сефарозе фирмы «BRL».

Прежде чем вернуться к самой реакции с участием Т4-полинуклеотидкиназы, необходимо упомянуть об источнике меченного по γ -фосфату АТФ с высокой удельной активностью. Сейчас ведущие фирмы («NEN», «Amersham») поставляют заказчикам еженедельно $(\gamma^{32}\text{P})\text{-АТФ}$ с $UA > 5000$ Ки/ммоль. Можно готовить высокомеченный АТФ и самим — с помощью ферментативной

реакции обмена между $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-H}_2\text{PO}_4$ (без носителя) и нерадиоактивным АТФ с участием 3-фосфоглицераткиназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [Maxam, Gilbert, 1977].

Т4-полинуклеотидкиназа способна присоединять γ -фосфат из АТФ на 5'-ОН-концы одностранных и двустранных молекул ДНК и РНК. Краткие сведения о ферменте: $M=140\,000$; $\text{pH}_{\text{опт}}=7,6$; активаторы — Mg^{2+} , полиамины, дитиотреитол (ДТТ); удельная активность — до $15\,000$ ед./мг; 1 ед. включает 1 нмоль ^{32}P в тимусную ДНК (активированную обработкой микрококковой нуклеазой) в условиях избытка субстратов за 30 мин при 37° . Хранят фермент в $0,05\text{ M}$ Трис- HCl , $\text{pH}\ 7,6$ (или в $0,02\text{ M}$ К-фосфате, $\text{pH}\ 7$), с $0,03\text{ M}$ KCl , 5 mM MgCl_2 , 5 mM ДТТ, $0,1\text{ мкМ}$ АТФ и 50% глицерина при -20° . Перед использованием его разбавляют $0,05\text{ M}$ Трис- HCl ($\text{pH}\ 7,6$) с 10 mM β -меркаптоэтанолом (или ДТТ) и $0,5\text{ мг/мл}$ БСА.

Введение метки в денатурированную ДНК осуществляют следующим образом. Малые и эквимольные концентрации ДНК (по 5'-ОН-концам) и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$ инкубируют с несколькими единицами Т4-полинуклеотидкиназы в $0,1\text{ мл}$ $0,05\text{ M}$ глицин- NaOH ($\text{pH}\ 9,5$) с 10 mM MgCl_2 , 5 mM ДТТ и 1 mM спермидина при 37° в течение 30 мин. Для остановки реакции добавляют $0,1\text{ мл}$ 4 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 20 мкг тРНК-носителя и $0,6\text{ мл}$ этанола, выдерживают при -70° и центрифугируют при $12\,000\text{ g}$. Осадок промывают этанолом и сушат в вакууме.

Заметим, что эту реакцию проводят далеко не при оптимальном значении pH . Это оправдано стремлением сохранить ДНК в одностранном, денатурированном виде. В других случаях лучше в качестве буфера использовать $0,07\text{ M}$ Трис- HCl ($\text{pH}\ 7,6$).

Концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза

В английской литературе этот фермент часто обозначают сокращенно «TdT» («Terminal deoxynucleotidyl transferase») или называют «ферментом Боллума» по имени его исследователя. Фермент выделяют из тимуса телят. Он может присоединять ^{32}P на 3'-ОН-конец ДНК (но не РНК), однако лишь в составе дополнительного дезоксирибонуклеотида, за счет соответствующего нуклеозидтрифосфата, несущего радиоактивный фосфор в α -положении. Присоединение идет к одностранным молекулам ДНК или к неспаренным 3'-ОН-концам рестриктазных фрагментов двустранных ДНК. Процесс может не ограничиваться одним нуклеотидом — произойдет наращивание цепочки гомополимера. В ограниченной степени фермент присоединяет и рибонуклеотиды, но тоже только на 3'-ОН-конец ДНК. Разумеется, если на 3-конца молекулы уже имеется фосфат, то его надо убрать с помощью фосфатазы, как было описано выше.

Краткие сведения о ферменте: $M\approx 32\,000$; состоит из субъединиц α и β с $M\ 8000$ и $24\,000$; активируется Mg^{2+} (присоединение пуриновых нуклеотидов) и Co^{2+} (присоединение пирими-

диновых); ингибируется хелирующими агентами (ЭДТА, о-фенантролином); $pH_{opt}=7,2$; удельная активность — до 20 000 ед./мг. 1 ед. присоединяет 1 нмоль дАМФ из дАТФ к (дТ)_n за 1 ч при 37°. Хранят фермент в 0,05—0,1 М К-фосфатном буфере (pH 6,9—7,2) с 1 мМ β-меркаптоэтанола и 50% глицерина при —20°. При разбавлении для сохранения активности фермента следует добавлять БСА до концентрации 30 мг/мл.

Используемый обычно для введения метки [α-³²P]-АТФ поставляется с УА 2000—3000 Ки/ммоль. ДНК, растворенную в 0,01 М Трис-НСl (pH 7,5) с 0,1 мМ ЭДТА, денатурируют нагреванием при 100° в течение 3 мин, быстро охлаждают и переводят в 0,1 М Na-какодилатный буфер (pH 6,9) с 1 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ ДТТ. Количество [α-³²P]-АТФ берут эквимольным по отношению к ДНК (считая по 3'-ОН-концам нитей); затем вносят соответствующее число единиц фермента. Инкубацию обычно ведут несколько часов при 37°. ДНК осаждают с тРНК-носителем и промывают этанолом, как указано выше [Махат, Gilbert, 1977].

Фермент Боллума можно использовать для присоединения к 3'-концу ДНК и других меченых или флюоресцирующих соединений. Для этого к ДНК описанным выше способом (с заменой MgCl₂ на CoCl₂) присоединяют нерадиоактивный 4-тиоуридин. Далее готовят N-производное иодацетамида вида ICH₂CONH—R, где R может содержать любую радиоактивную или флюоресцентную метку. Отщепляя иод, это производное легко присоединяется по сере тиюридина [Eshaghpour et al., 1979].

Т4-РНК-лигаза

Фермент выделяют из клеток *E. coli*, зараженных фагом Т4. С его помощью можно присоединять ³²P к 3'-ОН-концу РНК, но только в составе некоего 5',3'-нуклеозиддифосфата. Присоединение идет, в отличие от ДНК-лигазы, «на весу» — без участия матрицы. Сфера использования фермента, вообще говоря, значительно шире: он может «пришить» к 3'-ОН-концу РНК (или ДНК) любой полинуклеотид, имеющий фосфат на своем 5'-конце. Для введения метки на 3'-ОН-конец РНК в качестве донора радиоактивного фосфора чаще всего используют [5'-³²P]-фЦф. Этот нуклеозиддифосфат поставляется с УА до 3000 Ки/ммоль. Удельная ферментативная активность продажных препаратов Т4-РНК-лигазы составляет примерно 1000 ед./мг. 1 ед. фермента включает 1 ммоль устойчивого к действию фосфатазы ³²P в поли(А) из [5'-³²P] олигорибоаденилата (в определенных условиях) за 30 мин при 37°. Хранить фермент следует растворенным в 0,02 М Трис-НСl (pH 7,5) с 5 мМ β-меркаптоэтанола, 0,1 мМ ЭДТА, 50 мкМ АТФ и 50% глицерина при —20°.

Для проведения реакции в 10 мкл буфера (0,05 М HEPES, pH 7,5+15 мМ MgCl₂+3,3 мМ ДДТ+10 мкг/мл БСА+10% ДМСО) вносили 135 пмоль 5S РНК, 35 пмоль [5'-³²P] фЦф,

525 пмоль АТФ и 2—5 ед. Т4-РНК-лигазы. Смесь выдерживали в течение ночи при 0°, а затем РНК очищали переосаждением или электрофоретически [Peattie, 1979]. В этой прописи обращает на себя внимание присутствие диметилсульфоксида и АТФ в концентрации около 50 мМ. Последний, по-видимому, участвует в активации 3'-ОН-конца РНК.

К 3'-ОН-концу тРНК радиоактивный фосфор из [α - ^{32}P]-АТФ можно присоединить с помощью специфического фермента тРНК-нуклеотидилтрансферазы, ведущего в случае необходимости достройку ЦЦА-конца РНК, но способного катализировать и реакцию обмена концевой остатка адениловой кислоты [Repaud et al., 1979]. В тех случаях, когда не требуются высокие УА и энергия β -излучения ^{32}P , стабильную метку в тРНК вводят путем аминоацилирования меченной по ^{14}C или ^3H аминокислотой.

ДНК-полимераза I из *E. coli* (фермент Корнберга)

Если описанные ферментативные реакции позволяют осуществить включение ^{32}P только на один из заранее известных концов молекулы ДНК или РНК, то рассматриваемая ниже система позволяет получить нити ДНК, в которых практически весь фосфор представлен радиоактивным изотопом. Фермент ДНК-полимераза I из *E. coli*, которому вначале приписывали функцию репликации, на самом деле играет основную роль в репарации ДНК. Особенно эффективно он начинает комплементарный синтез ДНК в точке разрыва одной из нитей, используя вторую нить в качестве матрицы. Такой синтез можно условно назвать «трансляцией от разрыва». В английской литературе этот процесс называют «nick translation» («nick» — разрыв, щель). Трансляция идет в направлении 5'→3' достраиваемой разорванной нити, т. е. начиная от 3'-ОН-конца этой нити в месте разрыва. Как и для любого матричного синтеза ДНК, в качестве субстратов необходимы все четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата.

Замечательная особенность процесса трансляции от разрыва состоит в том, что (во всяком случае *in vitro*) он не ограничивается восполнением нуклеотидов, отсутствующих в месте разрыва, т. е. «заделкой» разрыва. Одновременно с синтетической фермент Корнберга обладает и экзонуклеазной активностью, причем также в направлении 5'→3'. Благодаря этому он убирает нуклеотиды, находящиеся впереди него в достраиваемой нити ДНК, уже за пределами первоначального разрыва, и тут же заменяет их на новые (в силу условия комплементарности — точно такие же) нуклеотиды за счет находящихся в среде нуклеозидтрифосфатов. Последние могут быть радиоактивно мечеными либо по основаниям (^{14}C , ^3H), либо по фосфору, стоящему в α -положении. В этом случае описанный процесс приводит к

синтезу нити ДНК, химически идентичной прежней, но радиоактивно меченной.

Введение радиоактивного фосфора в каждое нуклеотидное звено обеспечивает колоссальную радиоактивность продукта. Обычно в этом нет необходимости, так что ограничиваются использованием одного радиоактивного нуклеозидтрифосфата и трех немеченных. УА такой ДНК все равно оказывается огромной. Не следует забывать, что высокий уровень равномерного включения ^{32}P имеет свою обратную сторону. Каждый единичный акт радиоактивного распада атома ^{32}P связан с превращением его в атом серы, что приводит к разрыву сахарофосфатной цепочки полинуклеотида. При хранении такого препарата ДНК в течение нескольких дней он будет заметно деполимеризоваться.

Трансляция от разрыва не может быть бесконечной. Через 1—3 ч *in vitro*, в зависимости от условий, она прекращается. Каждая молекула фермента успевает за это время заменить несколько сотен, но не тысяч нуклеотидов. Чтобы получить полностью меченный продукт, не довольствуются случайными разрывами в молекулах исходной ДНК, а вносят их преднамеренно путем кратковременной обработки этих молекул ДНКазой I. Это — довольно деликатная операция, так как оптимальное количество ДНКазы и время обработки ею сильно зависят от третичной структуры ДНК. Например, для кольцевых сверхскрученных ДНК фагов и плазмид требуется гораздо бóльшая концентрация фермента, чем для линейных молекул. Вместе с тем, излишняя обработка ДНКазой приводит к чрезмерному укорочению получающихся фрагментов ДНК за счет многочисленных разрывов по двум нитям. Подбор условий обработки ДНКазой I производят эмпирически.

Реакцию трансляции от разрыва следует вести при пониженной против обычной температуре (14—15°). При температурах выше 22° ДНК-полимераза I ведет не только замену нуклеотидов, но и некоторый дополнительный синтез ДНК, по-видимому, за счет смещения нитей. Последнее связывают с тем, что экзонуклеазная активность фермента более термолабильна, чем синтетическая. Включение радиоактивности в ДНК линейно зависит от концентрации радиоактивного трифосфата в смеси (при условии избытка немеченных трифосфатов) вплоть до соотношения: ~1 нмоль меченого трифосфата на 1 мкг ДНК.

Молекулярная масса фермента составляет 109 000. Он активируется Mg^{2+} с оптимумом концентрации около 7 мМ. Активность зависит и от концентрации одновалентных катионов. Ингибиторами фермента служат антибиотики, блокирующие матричный синтез ДНК. Удельная ферментативная активность продажных препаратов составляет 3000—5000 ед./мг·1 ед. фермента, включает 10 нмоль нуклеотидов (суммарно) за 30 мин при 37° в находящуюся в избытке активированную ДНК или поли(АТ). Хранить фермент рекомендуется растворенным в 0.05 М

К-фосфатном буфере (рН 7) с 1 мМ β-меркаптоэтанола и 50% глицерина при -20° . Для некоторых целей используется и продается отдельно фрагмент ДНК-полимеразы I с M 76 000. Этот фрагмент обладает полимеразной активностью, но лишен экзонуклеазной. Его иногда называют «фрагментом Кленова».

Реакцию трансляции от разрыва для двунитевой сверхскрученной ДНК вируса SV-40 проводили следующим образом. 1,8 мкг ДНК SV-40 растворяли в 120 мкл 0,05 М К-фосфатного буфера (рН 7,4) с 5 мМ $MgCl_2$, содержащего дТТФ, дГТФ, дЦТФ и $[\alpha\text{-}^{32}P]$ -дАТФ — по 15 мкМ каждого. Для активации ДНК добавляли в 10 мкл раствора 1 мкг ДНКазы I. Смесь выдерживали 1 мин при комнатной температуре и охлаждали до 14° . Затем в 4 мкл раствора для хранения (см. выше) вносили 6 мкг (~ 25 ед.) ДНК-полимеразы I. После 30-минутного лаг-периода включение ^{32}P в ДНК нарастало в течение 2 ч, а потом прекращалось. Затем добавляли 60 мкл 0,25 М раствора ЭДТА (рН 7,4) и прогревали инкубационную смесь при 68° в течение 10 мин. Этого достаточно для инактивации обоих ферментов. Очистку от трифосфатов проводили на сефадексе G-50. Подсчет показал, что замещалось от 25 до 50% всех нуклеотидов ДНК. Средняя длина полученных фрагментов ДНК — 400 пар нуклеотидов. Полученная активность была столь велика, что позволяла обнаружить одну молекулу ДНК вируса на клетку хозяина (мыши) [Rigby et al., 1977].

Для сравнения можно указать, что в случае линейной двунитевой ДНК аденовируса-2 на 2 мкг ДНК, растворенной в 100 мкл 0,05 М Трис-НСl (рН 7,8) с 5 мМ β-меркаптоэтанола и 50 мкг/мл БСА, рекомендуется вносить на 10 мин при 15° всего лишь 10^{-4} мкг активированной охлаждением ДНКазы I, а затем 2 ед. ДНК-полимеразы I. Трансляцию ведут в течение 1 ч при той же температуре с участием $[^3H]$ -дАТФ в концентрации 1,8 мкМ и трех немеченных трифосфатов в концентрации 18 мкМ. Различие, как легко видеть, особенно велико для подготовительной обработки ДНК действием ДНКазы I.

Следует отметить, что в ходе матричного синтеза ДНК ее можно пометить радиоактивной ртутью, если в качестве субстрата использовать $[^{203}Hg]$ -дЦТФ, который включается в ДНК почти так же эффективно, как обычный дЦТФ. Ртуть легко присоединяется по C_5 цитидина в реакции с участием меркуриацетата [Dale et al., 1975]. $[^{203}Hg]$ -меркуриацетат имеется в продаже с УА до 20 мКи/мг. Меркурированную таким образом ДНК при равновесном ультрацентрифугировании в градиенте плотности раствора Cs_2SO_4 легко отделить от обычной ДНК. Кроме того, она избирательно связывается с тиоловыми сорбентами [Bhattacharya, Sarkar, 1981].

В заключение следует упомянуть, что очистку меченых ДНК и РНК от радиоактивных предшественников при всех описанных методах введения ^{32}P удобно проводить путем центрифуги-

рования инкубационных смесей через микроколонки сефадекса или Биогеля Р-30. Колонку готовят из пластикового шприца на 2 мл (или из конической пробирки, проколов в ней отверстие). Сначала гель увлажняют буфером и центрифугируют в колонке (вставленной в центрифужную пробирку) при 250 g в течение 10 мин. Гранулы геля в колонке после этого кажутся сухими, но на самом деле внутри они заполнены жидкостью. Затем на колонку наносят 0,3 мл инкубационной смеси и снова центрифугируют. ДНК полностью выходит из колонки в наружную пробирку, а низкомолекулярные предшественники задерживаются внутри гранул [Spraegen et al., 1979].

Глава 5

ВВЕДЕНИЕ РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКИ В БЕЛКИ И НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ IN VIVO

Этот подход к получению радиоактивно меченных биополимеров, не так давно универсальный, в настоящее время, особенно для высших животных, применяется все реже. Важнейшие причины этого перечислены ниже.

1. Развитие совершенных и мягких методов введения метки в очищенные препараты белков и НК *in vitro* с сохранением их физико-химических, а нередко и биологических характеристик.

2. Неизбежность включения изотопов, вводимых *in vivo*, через пути метаболизма во многие биополимеры, загрязняющие друг друга при последующем фракционировании.

3. Снижение и неопределенность УА радиоактивных предшественников, действительно используемых клеткой для синтеза биополимеров, ввиду разбавления их в собственном «пуле» клетки. Этот пул трудно поддается учету, так как его пополнение зависит от скорости протекания процессов катаболизма. Например, в печени около половины аминокислот, в том числе и «незаменимых», обязаны своим происхождением катаболизму собственных белков организма.

4. Значительно бóльший расход дорогостоящих радиоактивных препаратов.

5. Повышенная степень радиационной опасности ввиду использования больших количеств изотопов для питательных сред, а также проблема контроля радиоактивных экскрементов животных.

Разумеется, введение радиоактивной метки *in vivo* незаменимо при изучении физиологических аспектов метаболизма на клеточном и организменном уровне. Нередко для этой цели используют так называемую «импульсную метку», т. е. быстрое введение изотопа в организм животного (обычно путем инъекции) или в питательную среду клеток на относительно корот-

кое время с целью наблюдения динамики использования изотопа для синтеза белков и НК, изучения времени жизни макромолекул, путей их метаболизма и трансформации. По окончании импульса биологический процесс нередко останавливают — животное забивают, суспензию клеток охлаждают и центрифугируют. Еще более плодотворно использование импульсной метки в так называемых «чейз-опытах» *in vivo* (от англ. «chase» — охота). Здесь по окончании импульсной метки выбранной длительности биологический процесс не прерывают, но прекращают поступление в исследуемую цепь трансформаций радиоактивного предшественника, заменяя его снова нормальным, немеченым препаратом. Это позволяет проследивать во времени судьбу тех соединений и макромолекул, в которые радиоактивная метка успела попасть за время импульса.

Прекращения поступления или использования радиоактивного предшественника добиваются либо многократным его разбавлением «холодным» препаратом (для культур клеток и микроорганизмов), иногда с быстрой сменой питательной среды, либо блокированием начальных звеньев цепи метаболизма предшественника, например путем введения антибиотиков и ядов с точно известным местом атаки.

После этих общих замечаний рассмотрим вкратце некоторые варианты и аспекты введения радиоактивности в белки и НК *in vivo* в зависимости от характера биологических объектов.

ВЫСШИЕ ЖИВОТНЫЕ

Долговременное введение изотопов для создания стабильного уровня меченых предшественников и синтезируемых на их основе макромолекул осуществляют через диету животного. Для этого используют меченые аминокислоты, ^{14}C -карбонат для общей метки всех биополимеров и др. Радикальное, импульсное введение изотопа производят путем внутрибрюшинных, подкожных или внутривенных инъекций.

В качестве радиоактивного предшественника ДНК удобен меченный по метилу тимидин, РНК — уридин или оротовая кислота, белков — аминокислоты, из которых предпочтение следует отдать лизину и лейцину, так как они в ходе метаболизма не превращаются в другие аминокислоты.

Что касается количества вводимых радиоактивных препаратов или уровня их содержания в диете и ее продолжительности, то в зависимости от вида животного, радиоактивности и усвояемости меченого предшественника, путей его метаболизма и, наконец, характера поставленной задачи диапазоны могут быть столь широкими, что нет смысла их здесь пытаться очерчивать. В каждом конкретном случае приходится опираться на имеющийся опыт или набирать его в серии собственных экспериментов.

Дополнительные возможности открывает использование двойной изотопной метки. Например, можно провести сопоставление времени жизни (скорости обмена) различных белков в организме или определенном органе. Сначала животному вводят меченную ^{14}C аминокислоту и выжидают 4—6 дней. За это время все меченные ею белки успевают частично разрушиться в соответствии с интенсивностью своего обмена. После этого вводят ту же самую аминокислоту, но меченную ^3H , и через 4—6 ч животное забивают. К этому моменту ^3H -аминокислота успевает включиться во все новосинтезированные белки, и ее содержание характеризует их начальные концентрации. Между тем, уровень ^{14}C -радиоактивности для каждого из них будет тем ниже, чем дальше успел пройти процесс разрушения тех же белков, но первоначально меченных ^{14}C .

Сопоставляя отношения $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ для разных белков, можно сравнить скорости их катаболизма. Чем это отношение больше, тем короче время жизни соответствующего белка. Использование двойной метки здесь позволяет исключить из рассмотрения различие сопоставляемых белков по аминокислотному составу, а также неопределенность разбавления меченых аминокислот в собственном аминокислотном пуле организма — на значении отношения радиоактивностей эти факторы не могут сказаться [Schimke, 1975].

Иногда меченые аминокислоты выбирают с учетом известного состава сопоставляемых белков. Например, можно проследживать параллельно синтез гистонов и негистоновых белков хроматина, если вводить животному одновременно [^3H]-триптофан и [^{14}C]-лейцин, поскольку в составе гистонов нет триптофана.

Для сопоставления динамики синтеза ДНК и белков хроматина можно вводить меченный ^3H по метильной группе тимидин одновременно с [^{14}C]-лизином.

В тех случаях, когда желательно свести до минимума разбавление радиоактивной метки в пуле целого организма и неопределенность уровня поступления ее с кровотоком к данному органу, можно воспользоваться перфузией. Например, меченую аминокислоту можно вводить в печень мыши *in situ* через портальную вену (под наркозом). Спустя определенное время после такого импульсного введения метки всю тушку животного надо быстро охладить в ледяной воде, а затем извлечь печень для анализа включения меченой аминокислоты в белки [Sato et al., 1979].

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ

Исследование клеточного метаболизма с помощью радиоактивных предшественников белков и нуклеиновых кислот удобно осуществлять на культурах клеток. Введение метки при этом происходит через питательную среду. Аминокислоты, как правило, хорошо проникают через наружные мембраны клеток и исполь-

зуются ими для белкового синтеза. Если нет причин для специального выбора аминокислоты, удобно использовать метионин, поскольку его можно метить ^3H , ^{14}C и ^{35}S . В последнем случае нетрудно ввести в белок хотя и относительно короткоживущую, но очень интенсивную метку: [^{35}S]-метионин поставляется с УА 500—600 Ки/ммоль. Кроме того, с метионина в большинстве случаев начинается синтез полипептидной цепочки, что позволяет исследовать скорости инициации белкового синтеза. Например, Олейник и Саленго с помощью [^{35}S]-метионина определяли соотношение скоростей инициации и элонгации суммарного белкового синтеза в культуре клеток китайского хомячка. Для отделения концевых остатков метионина авторы использовали обработку полипептидов (на фильтрах) фенилизотиоцианатом, как это делается при секвенировании белков по методу Эдмана [Oleinick, Salengo, 1976].

Используя двойную метку метионина, Бринстер и соавторы в изящных опытах исследовали времена жизни различных белков в бластоцистах мыши. Бластоцисты на четвертый день после оплодотворения вымывали из половых путей и в количестве 100—150 штук инкубировали в капельке (25—50 мкл) среды Кребса—Рингера под силиконовым маслом при 37°.

Для одной группы бластоцистов в капельку добавляли на 1 ч [^3H]-метионин с УА 80 Ки/ммоль до концентрации 29 мкМ. Затем туда же вносили большой избыток «холодного» метионина (до 5 мМ) и инкубировали еще 4 ч (чейз-опыт).

Другую группу бластоцистов инкубировали сначала в течение 4 ч без изотопа, потом на 1 ч добавляли [^{35}S]-метионин и промывали средой, содержащей 5 мМ «холодного» метионина. Бластоцисты обеих групп смешивали, лизировали и проводили двумерное фракционирование их белков по методу О'Фаррелла (см. часть I). Пятна индивидуальных белков локализовали флюорографией, затем по шаблону рентгеновской пленки вырезали из геля, солибилизировали и для каждого из белков просчитывали двойную метку ^3H и ^{35}S . Отношение $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ служило мерой скорости распада белков. Измерения динамики выведения метки из белков и соответствующие расчеты позволили оценить и абсолютные времена полужизни 60 индивидуальных белков. Они оказались в пределах от 1 до 30 ч. Более половины белков имеют время полужизни меньше 10 ч [Brinster et al., 1979].

Для получения меченой ДНК в питательную среду культуры клеток на 18—20 ч, т. е. на время, достаточное для репликации ДНК, вносят примерно 10 мкКи/мл [^3H]-тимидина с высокой УА (до 100 Ки/ммоль). Импульсную метку в мРНК вводят с помощью [^3H]-уридина, внося его в питательную среду до концентрации примерно 0,2 мКи/мл на 1—2 ч. Поскольку УА [^3H]-уридина составляет около 50 Ки/ммоль, за это время можно получить включение ^3H в мРНК на уровне 10^8 имп./мин на 1 мг.

Можно для той же цели воспользоваться и [^{32}P]-ортофосфатом без носителя. Клетки выращивают в суспензии на полноценной питательной среде до концентрации 4×10^5 кл./мл, затем собирают центрифугированием, промывают питательной средой без фосфора, суспендируют (2×10^6 кл./мл) в такой же среде с добавлением диализованной сыворотки телят и на 2 ч вносят в эту среду [^{32}P]-ортофосфат до концентрации примерно 0,25 мКи/мл. Получается мРНК, высоко меченная радиоактивным фосфором.

Для исследования синтеза и процессинга ядерных предшественников мРНК в культуре клеток HeLa в питательную среду на 30 мин одновременно с [^3H]-уридином вносили в умеренном количестве актиномицин D (0,04 мкг/мл). Этого достаточно для блокирования синтеза рибосомальных РНК в ядрышке и включения изотопа только в пре-мРНК [Hegman, 1979].

МИКРООРГАНИЗМЫ

Меченный по метилу [^3H]-тимидин за 1 ч легко включается в ДНК до уровня, составляющего около 10% от внесенной в среду радиоактивности. Меченную ^{32}P бактериальную или фаговую ДНК получают аналогично описанному выше для клеток в культуре, внося примерно 0,1—0,2 мКи [^{32}P]-ортофосфата на 1 мл среды [Grossman, 1967].

Контроль за этим включением удобно вести на нитроцеллюлозных фильтрах. Аликвоты по 2 мкл бактериальной суспензии наносят на фильтр типа «Millipore NA». Бактерии на нем сорбируются. Их быстро промывают (трижды по 15 мл) 0,15 М раствором NaCl, а затем без вскрытия клеток (^{32}P !) в 10 мл воды просчитывают черенковское излучение. Выращивание бактерий прекращают при включении в них около 80% введенной в среду радиоактивности (можно сопоставлять с 2 мкл той же суспензии на фильтре без промывки).

Импульсную метку в мРНК бактерий осуществляют путем внесения в питательную среду [^{14}C]-урацила (0,2—1 мКи/мл) или [^{32}P]-ортофосфата (0,5—2 мКи/мл — после исчерпания или отмывки нерадиоактивного фосфора). Ввиду быстроты протекания процессов метаболизма у бактерий продолжительность такого импульса должна быть очень небольшой (10—30 с), поэтому приходится позаботиться о мгновенном прекращении жизнедеятельности микроорганизмов. Обычно этого достигают быстрым охлаждением, выливая суспензию на мелкоизмельченный лед, содержащий азид натрия [Hayes, Gros, 1968].

Метку в бактериальные белки, как и в белки высших организмов, удобно вводить с помощью [^{35}S]-метионина. Например, в недавней работе [Hogii et al., 1981] таким образом метили белки, синтезируемые на матрице ДНК плазмиды. 6 мл суспензии бактерий выращивали в среде M9 с 0,5% казаминовых кислот и 20 мкг/мл триптофана до плотности 2×10^8 кл./мл, облуча-

ли УФ-светом для стимулирования плазмидного синтеза и выращивали еще 16 ч. Затем клетки выдерживали в среде без серы в течение часа, вносили в нее [^{35}S]-метионин и инкубировали с ним еще 1 ч. Меченые клетки отмывали от радиоактивной среды трехкратным суспендированием в 0,2 мл 0,05 М Трис- HCl (рН 8) с 10 мМ ЭДТА, добавляли 0,2 мг лизоцима и лизировали тремя циклами замораживания и оттаивания. Затем проводили фракционирование белков электрофорезом в ПААГ и авто-радиографию.

Для более полного включения радиоактивной метки удобно использовать мутантные штаммы бактерий, ауксотрофные по одной из аминокислот или тимину.

Сравнительно легко включают радиоактивную метку и дрожжи. Например, для осуществления импульсной метки нуклеиновых кислот в 2 мл суспензии дрожжей, выращенных на полной питательной среде до плотности $2,7 \times 10^7$ кл./мл, вносят на 15 мин при 30° 0,2 мКи [^3H]-аденина с УА 55 Ки/ммоль. Рост клеток и включение изотопа останавливают разбавлением суспензии тремя объемами охлажденного до 0° буфера. В чейз-опытах вместо этого в среду вносят большой избыток «холодного» аденина.

Метку в белки дрожжей можно вводить из [^{35}S]-сульфата, который добавляют в питательную среду [Stephenson et al., 1980].

Глава 6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ ИЗОТОПНОГО РАЗБАВЛЕНИЯ

Выбирают реакцию, в которой определяемое вещество может участвовать в качестве исходного субстрата, и отрабатывают ее сначала с радиоактивным препаратом вещества. Условия реакции должны быть подобраны так, чтобы включение радиоактивности в конечный продукт зависело не от концентрации радиоактивного предшественника, а только от его удельной активности. Например, можно использовать реакцию аминоацилирования тРНК радиоактивной аминокислотой, когда эта аминокислота и соответствующая синтетаза находятся в избытке, а тРНК — в недостатке. Внесение в такую реакцию дополнительного количества немеченного предшественника (здесь — аминокислоты) означает разбавление, а следовательно, снижение УА исходного субстрата. В указанных условиях это приведет к уменьшению радиоактивности конечного продукта реакции.

Добавляя в стандартную инкубационную смесь (с неизменным количеством радиоактивного предшественника) постепенно возрастающие количества нерадиоактивного предшественника и регистрируя каждый раз соответственно уменьшенный уровень радиоактивности продукта, можно построить калибровочную

кривую. С ее помощью в аналогичной реакции легко определить неизвестное количество предшественника, вносимое в стандартную смесь, а следовательно, и его концентрацию в исследуемом растворе.

Преимущество метода — в его потенциально большой чувствительности. Используя вещества с высокой УА, абсолютные количества участвующих в реакции соединений можно свести до минимума.

Если вещество, количество которого определяют описанным способом, само является радиоактивным, но меченным по другому изотопу, чем радиоактивный предшественник в стандартной смеси, то, используя приемы счета двойной изотопной метки, можно одновременно с количеством добавляемого в смесь реагента зарегистрировать и вносимую им радиоактивность. Это позволит определить УА исследуемого вещества.

Метод изотопного разбавления не обязательно связывать с химической реакцией, преобразующей исходные вещества в новые продукты. Достаточно иметь способ, позволяющий относить уменьшающуюся за счет разбавления радиоактивность к одному и тому же количеству смеси меченого и немеченого препаратов (по существу, то же самое происходит и при протекании реакции, где использование смеси предшественников лимитировано другими компонентами системы). Для определения неизвестной концентрации аминокислоты таким способом может быть, например, данзилирование.

Радиоактивные аминокислоты стандартного раствора и добавляемые к ним «холодные» аминокислоты известной (для калибровочной кривой) или неизвестной концентрации данзилируются одинаково. Относя радиоактивность смеси к интенсивности ее флюоресценции после данзилирования, можно строить кривую изотопного разбавления. Замечательно, что здесь вовсе не требуется полнота данзилирования, лишь бы оно происходило воспроизводимо в стандартных условиях опыта и при построении калибровочной кривой. Еще удобнее для этой цели воспользоваться радиоактивно меченным по другому изотопу данзилхлоридом [Airhart et al., 1979].

Точно такой же подход был недавно использован для анализа аминокислотного состава белка, причем чувствительность метода, по утверждению авторов, не уступает самым лучшим аминокислотным анализаторам [Humphries, Thompson, 1980]. В качестве реагента, позволяющего стандартизировать суммарное количество радиоактивных и нерадиоактивных аминокислот, вместо данзилхлорида был использован [^3H]-1-фтор-2,4-динитробензол (ФДНБ). Авторы использовали препарат [^3H]-ФДНБ производства фирмы «Amersham» с УА 200 мКи/ммоль. В каталоге 1981 г. эта же фирма указывает для него УА 10—30 Ки/ммоль.

10 мкл (1 мкг) полного гидролизата белка (6 н. HCl, 110°, 20 ч) или известной смеси «холодных» аминокислот (для построения

калибровочных кривых) смешивали с 10 мкл стандартного раствора всех [^{14}C]-аминокислот, высушивали в вакууме и растворяли в 20 мкл 0,1 М триэтиламмонийбикарбонатного буфера, рН 9,7. Затем туда добавляли 3 мкл раствора [^3H]-ФДНБ (1 мКи/мл) в бензоле. Для перемешивания реактивов, находящихся в разных фазах, их кратковременно обрабатывали ультразвуком при 60°, затем смесь высушивали над концентрированной H_2SO_4 и NaOH , растворяли в 2 мкл метанола и наносили на полиамидную пластинку для ТСХ размером 7,5×7,5 см. В первом направлении аминокислоты разделяли смесью толуол— CH_3COOH (4:1), а во втором — смесью HCOOH —вода (6:7). Флюорография после обработки пластинок, как обычно, 7%-ным раствором ППО в эфире позволяла идентифицировать положения всех пятен аминокислот. Пятна вырезали, каждое элюировали 30 мин в 0,15 мл этанола, элюаты обрабатывали солюбилизатором и просчитывали в них двойную метку ^3H и ^{14}C с учетом тушения. Для каждой из аминокислот заранее была снята калибровочная кривая, построенная, как описано выше, по степени изотопного разбавления, т. е. по отношению радиоактивностей $^{14}\text{C}/^3\text{H}$. Аминокислоты присоединяют [^3H]-ФДНБ, а затем разделяются ТСХ независимо друг от друга, поэтому одна описанная обработка эквивалентна анализу на содержание каждой аминокислоты в препарате.

В компьютер счетчика вводили все калибровочные кривые, и после просчета в определенном порядке элюатов всех пятен аминокислот прибор выдавал аминокислотный состав белка. Время, необходимое для анализа одного белка, — 24 ч, но оно определяется главным образом длительностью ТСХ, а ее несложно вести параллельно для нескольких белков.

Таким образом, можно обойтись и без дорогостоящего аминокислотного анализатора. Более того, метод двойной метки оказывается более гибким. Например, можно вести анализ только по некоторым интересующим аминокислотам, вырезая нужные пятна. Метод удобно использовать и для анализа белков бактериальной стенки, где присутствие большого количества аминокислот из пептидогликанов понапрасну перегружает аминокислотный анализатор, но не мешает разделению с помощью ТСХ.

Методом изотопного разбавления можно определять концентрации тех или иных биологических активных молекул в составе сложных смесей и физиологических жидкостей. Например, недавно этим методом определили концентрацию фактора элонгации eIF-2 в лизате ретикулоцитов [Safer et al., 1979].

РАДИОИММУННЫЕ МЕТОДЫ

В принципе большинство этих методов представляет собой варианты метода изотопного разбавления, где реакцией, выявляющей конкуренцию радиоактивных и нерадиоактивных (разбавляющих) предшественников, служит реакция образования иммунного комплекса антиген—антитело. Разнообразие радиоиммунных методов связано главным образом с различием способов обнаружения этих комплексов или удаления их из раствора. Значение радиоиммунных методов для современной молекулярной биологии столь велико, что их необходимо рассмотреть подробнее и посвятить этому отдельную главу, тем более что это — методы новые и многие биохимики с ними еще плохо знакомы. Между тем, складывается впечатление, что в ближайшие годы ни одно серьезное исследование без них обойтись не сможет.

Использование радиоактивных изотопов в сочетании с иммунологическими методами исследования позволяет исключительную избирательность последних реализовать для ничтожно малых количеств биополимеров. Чувствительность радиоиммунных методов позволяет обнаруживать и определять нанограммовые, а иногда и пикограммовые количества индивидуальных белков и гормонов пептидной природы на фоне колоссального избытка родственных им молекул. Избирательность при работе с нуклеиновыми кислотами пока что заметно ниже (при том же уровне чувствительности метода), но прогресс и здесь явно заметен. Радиоиммунные методы широко используются для исследования сахаров, липидов и других биологически активных соединений, однако эти приложения выходят за рамки настоящей книги.

В части II специальная глава была посвящена изложению необходимых основ иммунохимии. Чтобы не повторяться, будем считать, что читателю они уже известны. Описанные выше способы введения радиоактивной метки в белки и нуклеиновые кислоты позволяют получать меченные *in vitro* антигены и антитела с высокой удельной радиоактивностью. Чаще всего для этой цели используют радиоактивный иод. Особо важное значение имеет возможность получения в больших количествах радиоактивно меченного белка А из оболочки *Staphylococcus aureus*. Напомним, что этот белок обладает свойством «узнавать» и избирательно связывать константную часть большинства антител. Правда, некоторые подклассы иммуноглобулинов (например, IgG1 мыши) с белком А не связываются, так что возможность использования этого белка надо проверять. Меченный ^{125}I белок А поставляется фирмой «Amersham» с $\text{UA} > 30$ мКи/мг (каталог 1981 г.).

Общим подходом для всех рассматриваемых ниже радиоиммунных методов является преципитация (или сорбция) иммунного комплекса, в котором один из партнеров радиоактивен. При этом используются новые методы иммунопреципитации, не нуж-

дающиеся в образовании описанной в части II пространственной сетки. Тем самым снимается сформулированное ранее требование эквивалентности концентраций антител и антигенов — их иммунные комплексы осаждаются или сорбируются независимо друг от друга. В связи с этим открылась и оказалась особенно плодотворной возможность использования конкуренции радиоактивных и немеченных антигенов за образование иммунных комплексов с антителами, находящимися в недостатке (лимитирующими реакцию), как было описано в методе изотопного разбавления. Такой подход позволяет осуществить количественное определение ничтожного содержания некоего антигена в сложной смеси нативного немеченого препарата, если в распоряжении экспериментатора имеется соответствующее радиоактивно меченное чистое вещество.

Другим плодотворным приемом оказалось использование двойных и тройных иммунных систем, когда, например, к первоначальным комплексам антиген—антитело присоединяются антитела, полученные от другого животного, иммунизированного сывороткой первого донора. Эти так называемые «вторичные» антитела «узнают» антитела, входящие в состав первичного иммунного комплекса, поскольку для второго животного первичные антитела являются антигенами. Кроме того, в систему можно ввести еще и белок А, способный присоединяться к одинарному или двойному иммунному комплексу, поскольку константная часть соответственно первичного или вторичного антитела в этих комплексах остается свободной. Белок А можно иммобилизовать на некоей матрице, создав тем самым сорбент для антител и иммунных комплексов. Этот белок можно использовать и прямо в составе бактериальной стенки. Убитые, но не разрушенные бактерии *Staphylococcus aureus*, за счет белка А способны связывать иммунные комплексы, в результате чего преципитация этих комплексов из раствора сводится к осаждению бактерий низкоскоростным центрифугированием.

Детали использования этих и других подходов в наборе радиоиммунных методов будут описаны ниже. Прежде чем обратиться к наиболее тонким — конкурентным методам изотопного разбавления, рассмотрим подробно упомянутые выше новые способы преципитации и сорбции индивидуальных иммунных комплексов. Для простоты и, вместе с тем, полноты освещения этого вопроса начнем с некоторых примеров выделения нерадиоактивных комплексов. Это послужит введением к использованию тех же приемов в сочетании с радиоактивной меткой.

ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ И СОРБЦИЯ ИЗ РАСТВОРА

Система двух антител

Рассмотрим в качестве примера недавно опубликованный способ очистки пуриннуклеотидфосфорилазы (ПНФ) из плаценты методом иммунопреципитации [Changas, Reem, 1979].

Сначала получали антисыворотку против ПНФ. Для этого очищенный фермент в концентрации 0,75 мг/мл гомогенизировали с равным объемом адъюванта Фрейнда, предварительно разбавленного вдвое 0,01 М К-фосфатным буфером (рН 7,3) с 0,15 М NaCl. По 150 мкг фермента в этой смеси вводили кролику подкожно, одновременно в пяти местах. Инъекции повторяли на 14, 51 и 72-й дни. Спустя еще 10 дней титр специфических анти-тел (по Ухтерлони) достигал наибольшего уровня. После этого отбирали кровь и обычными приемами очищали антисыворотку кролика против ПНФ.

Иммунопреципитацию осуществляли следующим образом. 0,1 мл суммарной ферментной фракции из плаценты суспендировали в буфере (0,02 М Трис-HCl, рН 7,9+5 мМ MgCl₂+0,1 мМ ЭДТА+0,6 мМ ДТТ+20 мМ KCl), содержащем по 0,25% Три-тона X-100 и дезоксихолата натрия. Детергенты были введены для предотвращения возможности неспецифической агрегации компонентов иммунной реакции и их комплексов. К суспензии добавляли 0,5 мкл иммунной антисыворотки кролика. Это количество антисыворотки содержит большой избыток антител по отношению к находящемуся в 0,1 мл ферментной фракции количеству ПНФ. Такой избыток, с одной стороны, обеспечивает связывание в индивидуальные иммунные комплексы (здесь сетка не образуется) всех молекул ПНФ, а с другой—подготавливает выполнение условия эквивалентности концентрации для образования пространственной сетки со вторичными антителами козы, для которых антитела из сыворотки кролика являются антигенами. Если для полного связывания ПНФ можно обойтись меньшим, чем 0,5 мкл, объемом иммунной антисыворотки кролика, то этот объем следует дополнить до 0,5 мкл его неиммунной сывороткой. В отношении взаимодействия со вторичными антителами обе сыворотки эквивалентны.

Ферментную фракцию с добавленной в нее антисывороткой кролика инкубировали 3—5 ч на холоду. За это время реакция образования первичных иммунных комплексов проходила до конца. Преципитата, как уже упоминалось, не образуется из-за ничтожности концентрации антигена (ПНФ) и неэквивалентности концентраций антигена и первичных антител. Затем к смеси добавляли 3,5 мкл продажного препарата антисыворотки козы против иммуноглобулинов кролика и инкубировали еще 3—5 ч на холоду. Теперь уже формировалась сетка иммунопреципитата, где в качестве антигенов выступали иммуноглобулины кролика, связанные или не связанные в иммунные комплексы с ПНФ.

Соотношение 0,5 мкл сыворотки кролика и 3,5 мкл антисыворотки козы, очевидно, было подобрано как оптимальное (эквивалентное) их соотношение для иммунопреципитации. Такой преципитат легко осаждается центрифугированием. Фермент из осадка нетрудно освободить, диссоциируя иммунный комплекс подкислением.

В принципе аналогичный прием используется для выделения индивидуальных мРНК. Методом иммунопреципитации в системе двух антител удается отобрать и отделить полисомы, ведущие синтез именно того белка, который кодируется нужной мРНК. Очевидно, что и сама эта мРНК отделяется вместе с полисомами от всех прочих мРНК, каково бы ни было их разнообразие и обилие в системе, где могут одновременно идти синтезы сотен других белков. Отбор производится в тот момент, когда полипептидная цепочка названного белка еще не отделилась от полисомы — первичные, «распознающие» антитела вырабатываются именно против этого белка. Их с избытком «сажают» на полисомы, а затем вносят вторичную антисыворотку против первичных иммуноглобулинов в эквивалентной с ними концентрации. В образующийся преципитат попадают только полисомы, ведущие синтез данного белка, а вместе с ними и кодирующая его мРНК. В этих опытах первичные антитела обязательно очищают на имуносорбенте или иным путем, чтобы повысить их специфичность к нужному белку. Для иллюстрации описываемого подхода, а также некоторых дополнительных иммунохимических приемов процитируем некоторые моменты из недавней работы, где проводилась очистка мРНК галактокиназы (ГК) из дрожжей [Schell, Wilson, 1979].

1,5 мг хорошо очищенной ГК диализовали против 0,01 М Na-фосфатного буфера (рН 7) и добавляли к ней 1 мг метилированного БСА, так что конечный объем раствора составлял 1 мл. Его эмульгировали с равным объемом полного адъюванта Фрейнда многократным пропусканием через иглу 22-го калибра. Кролика иммунизировали введением этой эмульсии между подушечек лап дважды, с интервалом в 2 недели (второй раз — 0,5 мг ГК). Затем в течение 1—2 недель с интервалом в 3 дня из ушной вены отбирали по 50 мл крови для выбора препарата с наибольшим титром специфических антител (по Ухтерлони).

IgG тщательно очищали от примеси РНКазы — это важно для последующей сохранности мРНК. Глобулины иммунной сыворотки осаждали сульфатом аммония (40% насыщения), перерастворяли, диализовали против 0,01 М Na-фосфата (рН 7,2) с 0,15 М NaCl и очищали в двухслойной колонке ДЭАЭ-целлюлозы (нижний слой) и КМ-целлюлозы, уравновешенной тем же буфером. IgG свободно проходят через такую колонку, а РНКаза в ней полностью задерживается. После дополнительной очистки IgG гель-фильтрацией на сефадексе G-100 следовал важный этап повышения степени специфичности препарата IgG (напомним о полиспецифичности иммунного ответа, а также о том, что иммунизация резко увеличивает содержание в сыворотке специфических антител, но не удаляет из нее исходные, нормальные антитела). В данном случае для этой цели удобно было воспользоваться мутантным штаммом дрожжей, практически лишенных галактокиназы.

Иммунный IgG инкубировали с цитозолем мутантного штамма. Все примесные IgG кроме ГК-специфичного, связывались с соответственными белками цитозоля (антигенами). Оставшиеся свободными ГК-специфичные антитела очищали в той же последовательности операций, что и выше. Разумеется, инкубации предшествовала жесткая обработка цитозоля ингибиторами протеаз: диизопропилфторфосфатом (0,016%) и фенилметилсульфонилфторидом (4 мМ) в течение 2 ч при 4°.

Для отбора путем иммунопреципитации в буфер (0,025 М Трис-HCl, pH 7,1, +0,15 М NaCl+5 мМ MgCl₂+0,5 мг/мл гепарина) вносили полисомы нормального штамма дрожжей до концентрации 28 ед. A₂₈₀ на 1 мл и очищенный IgG против ГК в концентрации 0,7 мг/мл. Для дополнительной (конкурентной) защиты от РНКаз, помимо гепарина, добавляли еще тРНК *E. coli* до концентрации 50 мкг/мл. Эту смесь инкубировали 45 мин при 0°, затем добавляли, как и выше, антисыворотку козы против иммуноглобулинов кролика в отношении 50:1 (объем/масса) к содержащемуся в смеси IgG и держали еще час при 0°. Центрифугирование (10 000g; 15 мин) осаждало только полисомы, ведущие синтез ГК и «заряженные» соответствующей мРНК. Затем следовала обычная процедура депротеинизации и отделения мРНК от рибосомальных РНК на олиго(dT)-целлюлозе.

В другой аналогичной работе при очистке мРНК для легкой цепи миозина (ЛЦМ) из сердца зародыша цыпленка обогащение антисыворотки нужным IgG вели, как обычно, на иммуносорбенте, используя для этой цели ЛЦМ, «посаженную» на BrCN-активированную сефарозу 4В. IgG против ЛЦМ сорбировали из иммунной антисыворотки на иммуносорбент и промывали там, а затем десорбировали его высокой концентрацией соли двухвалентного металла (4,5 М MgCl₂).

Для облегчения преципитации вторичные антитела козы добавляли не в растворе, а в виде уже нерастворимой пространственной сетки, предварительно сшитой глютаровым альдегидом. Такая сетка вполне успешно извлекает из раствора и связывает первичные антитела вместе с полисомами. Это освобождает от заботы об эквивалентности концентраций первичных и вторичных антител и достаточности этих концентраций для образования иммунопреципитата [Arnold, Siddiqui, 1979].

Если индивидуальный белок, для которого очищается мРНК, имеется в достаточном количестве, то иммунопреципитацию можно осуществить и без помощи вторичных антител. После окончания избирательной реакции первичных антител с полисомами их можно связать добавлением избытка белка-антигена, также в виде нерастворимой сетки, сшитой глютаральдегидом. Напомним, что каждое антитело имеет два участка связывания антигена. Один из этих участков после присоединения антитела к полисоме остается свободным. По нему антитело, а через нее и вся полисома связывается с нерастворимой сеткой вносимого

белка-антигена. Этот прием был использован еще в 1974 г. для очистки овальбуминовой мРНК из гомогената яйцевода курицы [Schimke et al., 1974].

Использованный здесь прием внесения уже готовой к преципитации иммунной системы настолько удобен, что естественно было ожидать появления продажных препаратов такого типа, тем более что от вторичных антител не требуется специфической избирательности — они должны «узнавать» просто иммуноглобулины сыворотки первичного донора.

Действительно, французская фирма «International CIS» недавно начала производить «PR immuno-precipitating reagent». Это — не что иное, как пространственная сетка, образованная антителами овцы против иммуноглобулинов кролика и самими этими иммуноглобулинами из сыворотки нормального, неиммунизированного кролика. Пропорции компонентов в этой сетке подобраны таким образом, что антитела овцы находятся в достаточном избытке, чтобы дополнительно связать большое количество иммуноглобулинов кролика из раствора. Сетка измельчена в такой степени, что образуемые ею частицы могут длительное время оставаться в суспензии, откуда их легко осадить (вместе с захваченными специфическими иммунными комплексами) низкоскоростным центрифугированием. Отсутствие какой-либо несущей матрицы сводит до минимума ($<2\%$) неспецифическую сорбцию белков на сетке. Связывание иммунных IgG из раствора занимает 15—30 мин.

Американская фирма «Bio-Rad» для этой же цели производит вторичные антитела, ковалентно связанные с поверхностью гидрофильных гранул на основе полиакриламида диаметром 5—10 мкм. Фирменное название таких гранул — «Immunobead solid phase antibodies». В продаже имеются гранулы с наиболее употребительными антителами козы против иммуноглобулинов кролика, а также с антителами кролика против иммуноглобулинов козы, овцы, мыши, морской свинки, IgG, IgA и IgM человека. «Immunobeads» поставляются лиофилизированными или в виде суспензии, которая может храниться в течение месяца. После встряхивания суспензия остается стабильной в продолжение нескольких часов. Вместе с тем, «Immunobeads» можно легко осадить центрифугированием (1000 g; 5 мин) и промывать с переосаждениями. Активность антител на поверхности гранул достаточно высока — образование иммунных комплексов занимает 1—2 ч при 4°. Инкубацию ведут при pH 6—8 в присутствии 0,15 M NaCl. Концентрацию гранул в суспензии не имеет смысла поднимать выше 5 мг/мл. В большинстве случаев для осуществления радиоиммунной реакции (см. ниже) бывает достаточно 0,1—1 мг «Immunobeads».

Антитела, фиксированные на гранулах «Immunobeads», можно использовать не только как вторичные, но и как первичные антитела для прямого осаждения антигенов или в конкурентных радиоиммунных системах. Разумеется, продажные «Immunobe-

ads» не обладают специфичностью к определенным белкам. Однако высокоспецифичные гранулы можно приготовить в лаборатории, если имеются хорошо очищенные специфичные антитела, с помощью поставляемого той же фирмой набора «Immunobead reagent coupling Kit». В этот набор входят свободные, незамещенные гранулы и водорастворимый карбодимид для посадки любых антител на их поверхность.

Использование *Staphylococcus aureus* и белка А, закрепленного на сефарозе

Белок А, способный образовывать прочные комплексы с F_c иммуноглобулинов, сохраняет эту способность и в составе стенки бактерии *S. aureus*. Через этот белок иммуноглобулины связываются с бактериальными клетками и вместе с ними могут быть легко осаждены низкоскоростным центрифугированием. Ни о каких пропорциях, кроме достаточного количества бактерий, заботиться нет необходимости.

Исследуя продукты трансляции мРНК интерферона человека *in vitro*, Вейссенбах и соавторы использовали эту возможность для иммунопреципитации интерферона [Weissenbach et al., 1979]. Антисыворотку против него получали в результате 6—10 подкожных инъекций кролику очищенного интерферона (2×10^9 ед./мл) в смеси с полным адъювантом Фрейнда дозами по 10^6 ед. с интервалами в 2—3 недели. Суммарную мРНК очищали из индуцированной к продукции интерферона культуры фибробластов человека. К 25 мкл инкубационной смеси на основе лизата ретикулоцитов, ведущей трансляцию этих мРНК, добавляли равный объем разбавленной в фосфатно-солевом буфере антисыворотки против интерферона и выдерживали 1 ч при комнатной температуре для полного образования иммунных комплексов. Затем добавляли 25 мкл суспензии убитых нагреванием и фиксированных формалином бактерий *S. aureus*. Авторы готовили препараты бактерий согласно первоначальной прописи [Kessler, 1975]. Следует помнить, что живые бактерии *S. aureus* патогенны и при работе с ними надо принимать все необходимые меры предосторожности. Сейчас убитые и подготовленные к использованию бактерии поставляются фирмой «Calbiochem» под торговым названием «Rapsorbip» в виде 10%-ной суспензии клеток в фосфатно-солевом буфере с добавлением 0,1% азида натрия. 100 мг клеток связывают до 2 мг IgG.

После выдерживания смеси в течение еще одного часа бактерии собирали центрифугированием и промывали буфером. Для подготовки к последующему анализу электрофорезом в ПААГ с ДДС-Na осадок суспендировали, как обычно, в 3%-ном растворе ДДС-Na с 0,7 М β -меркаптоэтанолом, 10% глицерина и 0,06 М Трис-HCl (pH 6,8) и прогревали при 100° в течение 5 мин. Такая обработка одновременно диссоциирует иммунные комплексы и освобождает интерферон.

В этой же работе для тех же целей иммунопреципитации использовали вместо *S. aureus* суспензию белка А, ковалентно закрепленного на гранулах сефарозы. Продажный препарат этого своеобразного сорбента поставляется фирмой «Pharmacia» в виде лиофилизированного порошка под торговым названием «Protein A-Sepharose CL4B».

В 1 мл набухшего сорбента содержится 2 мг белка А, способного связать 20 мг IgG (молекулярная масса белка А вчетверо меньше, чем у IgG, и на одной молекуле белка имеется несколько участков связывания).

На поверхности бактерий может происходить неспецифическая сорбция продуктов трансляции. Это обстоятельство в аналогичной работе было учтено: в 120 мкл инкубационной смеси после удаления из нее рибосом (центрифугированием) вносили 50 мкл «Pansorbin» одновременно с детергентом NP-40 (0,25%). После 15-минутной выдержки на холоду эту порцию бактерий удаляли центрифугированием. Только после этого к супернатанту добавляли специфическую антисыворотку и новую порцию «Pansorbin» [Towle et al., 1980]. Такой же прием был использован несколько раньше [Ibarie, Jones, 1979].

Двукратная иммунопреципитация с участием *S. aureus* была использована в изящной работе Кингсман и соавторов для выделения вирусспецифического белка из культуры клеток почки обезьяны, зараженных вирусом SV-40. 100 мкл клеточного экстракта сначала инкубировали с 9 мкл нормальной сыворотки хомячка (2 ч, 4°), затем добавляли 100 мкл «Pansorbin», инкубировали еще 30 мин и осаждали бактерий центрифугированием. Таким образом, из экстракта были удалены все белки-антигены, связывающиеся с нормальными компонентами сыворотки хомячка. К супернатанту добавляли еще 7 мкл сыворотки хомячка, имевшего опухоль, индуцированную вирусом SV-40. Сыворотка такого хомячка, очевидно, содержит в своем составе дополнительные антивирусные антитела. За более продолжительной инкубацией (24 ч, 4°) следовало внесение новой порции «Pansorbin», который на этот раз осаждал только вирусспецифические иммунные комплексы [Kingsman et al., 1980].

«Protein A-Sepharose» была использована недавно для быстрого выделения методом иммунопреципитации комплекса трех ферментов, осуществляющих первые этапы метаболизма пириимидинов и составляющих в сумме всего лишь 0,05% суммарного клеточного белка. Иммунный комплекс сначала снимали с сорбента экстракцией 1 М CH_3COOH , а затем диссоциировали в денатурирующем буфере с ДДС-Na для последующего электрофореза [Davidson, Patterson, 1979].

«Посадив» на «Protein A-Sepharose» моноспецифические антитела, можно получить иммуносорбент, пригодный для очистки соответствующего антигена. В интересах надежного и многократного использования такого иммуносорбента относительно

слабое связывание антител с белком А следует заменить на ковалентную связь путем «сшивки» белков с помощью какого-либо бифункционального агента. В частности, хорошие результаты были получены при использовании для этой цели диметилсуберимидата $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{C}(\text{NH}_2)^+-(\text{CH}_2)_6-\text{C}(\text{NH}_2)^+-\text{O}-\text{CH}_3$. По-видимому, значительная длина такого «мостика» облегчает доступ антигена к иммобилизованному антителу и обеспечивает необходимую для образования комплекса свободу его ориентации [Reeves et al., 1981].

Все эти современные методы осаждения иммунных комплексов не связаны с использованием радиоактивности, однако сведения о них полезны при рассмотрении способов такого использования, к которым теперь можно перейти. Первые два способа относятся к простой преципитации, поэтому их уместно рассмотреть в данной главе.

Радиоактивно меченные антитела

Как будет видно из дальнейшего, радиоактивную метку чаще всего вводят в антигены для использования их в методах конкуренции. Но иногда метка в антиген включается плохо (мало тирозина!) или нарушает антигенные свойства белка (тирозин в антигенном детерминанте). В этих случаях бывает целесообразно ввести метку ^{125}I в специфические антитела, участвующие в иммунопреципитации исследуемого антигена. Например, для количественного определения содержания липопроотеинлипазы (ЛПЛ) цыплят Шенг и соавторы использовали следующий прием. Антитела против ЛПЛ получали из иммунной сыворотки козы и очищали их на иммуносорбенте, которым служила очень чистая ЛПЛ, иммобилизованная на сефарозе. Часть очищенных антител с помощью карбодимиды закрепляли на полиакриламидных гранулах типа «Imticipobeads» (см. выше), а другую часть метили радиоактивным иодом. Тканевому экстракту, в котором определяли ЛПЛ, давали прореагировать с заряженными гранулами, проверив, что ЛПЛ в экстракте находится в недостатке по отношению к количеству закрепленных специфических антител. Затем гранулы промывали и инкубировали с избытком радиоактивно меченных антител к ЛПЛ. По связывающейся с гранулами радиоактивности с помощью калибровочной кривой судили о количестве ЛПЛ в экстракте [Cheung et al., 1979]. Все это в данном случае было необходимо ввиду того, что в саму ЛПЛ метка включается плохо. В противном случае можно было бы использовать более простые методы, основанные на конкуренции антигенов и описанные ниже.

Следует привести некоторые, представляющие специальный интерес технические подробности этой работы. При очистке IgG на ЛПЛ-сефарозе элюцию вели 0,5 М NaCl в 0,2 М глицин-HCl, pH 2,8. Во фракции добавляли равный

объем 0,2 М Трис-НСl (рН 8) для восстановления нейтральности среды. Объединенные фракции, содержащие анти-ЛПЛ-IgG, днализировали против фосфатно-солевого буфера (0,01 М К-фосфат, рН 7,2+0,15 М NaCl) и концентрировали ультрафильтрацией. Метку в анти-ЛПЛ-IgG вводили из Na^{125}I с помощью H_2O_2 и иммобилизованной на сефарозе лактопероксидазы (фирмы «Sigma»). УА полученного препарата составила $2,5 \times 10^{11}$ имп./мин на 1 мкмоль. Для приготовления иммуносорбента на гранулах «Immunobeads» 4,8 мг очищенного анти-ЛПЛ-IgG инкубировали со 100 мг гранул в течение 1 ч при 4° в 10 мл 3 мМ фосфатного буфера, рН 6,3, затем вносили 20 мг водорастворимого карбодимида [1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид-НСl] и выдерживали в течение ночи на холоду. Сорбент тщательно промывали фосфатно-солевым буфером, потом отмывали от неспецифически сорбировавшихся белков 5 М раствором гуанидинхлорида в том же буфере и снова буфером. Перед использованием выясняли емкость полученного иммуносорбента. К 100 мкг гранул добавляли, в серии аликвот по 0,2 мл, постепенно возрастающие количества хорошо очищенной ЛПЛ (от $0,1 \times 10^{-3}$ до 6×10^{-3} мкг). Для уменьшения неспецифической сорбции «посадку» ЛПЛ на сорбент осуществляли в буфере, содержащем 0,75 М NaCl, 0,01 М Na-фосфат (рН 7,4), 0,25% БСА и 14% глицерина. Такая концентрация соли не мешала образованию иммунных комплексов, но затрудняла сорбцию. Смесь инкубировали 1 ч при 20° и 1 ч при 4°, промывали порциями по 0,5 мл 1 М NaCl и 0,15 М NaCl в том же фосфатном буфере без прочих добавок и собирали центрифугированием. Осадок суспендировали в 0,2 М NaCl с 0,01 М Na-фосфата (рН 7,4) и 10% глицерина, вносили избыток (1,25 мкг) радиоактивного анти-ЛПЛ-IgG, инкубировали, отмывали, как описано выше, и просчитывали связавшуюся с сорбентом радиоактивность в γ-счетчике.

После этого строили кривую насыщения иммуносорбента ЛПЛ и далее, при определении содержания фермента, не выходили за пределы линейного участка этой кривой (судя по радиоактивности). Этот участок и служил калибровочной прямой для определения неизвестного содержания ЛПЛ в препарате, который «сажали» на сорбент в точно таких же условиях.

Радиоактивно мечеными могут быть и вторичные антитела в системе двух антител. Пример их использования приведен ниже, в одном из методов отбора гибридом.

Радиоактивно меченный белок А

Сам по себе белок А не участвует в иммунопреципитации, но если с помощью системы двух антител (или другим способом, оставляющим свободной константную часть иммуноглобулинов F_c) преципитат образован, то его количественную оценку или хотя бы радиоактивную маркировку можно осуществить с помощью радиоактивно меченного белка А. Как уже упоминалось, ^{125}I -белок А имеется в продаже или может быть получен в лабораторных условиях.

В качестве примера приведем использование ^{125}I -белка А для тестирования антисыворотки против актина [Lessard et al., 1979]. Очищенный актин «сажали» на BrCN-активирован-

ную сефарозу, получая иммуносорбент. В центрифужной полиэтиленовой пробирке на 0,25 мл в объеме 0,1 мл 0,01 М Трис-НСI (рН 7,4) с 0,15 М NaCl и 5 мг/мл БСА (последний — для подавления за счет конкуренции неспецифической сорбции антител и ^{125}I белка А) смешивали и инкубировали этот иммуносорбент с антисывороткой, взятой в недостатке для обеспечения полного связывания специфических антител.

Несвязавшийся материал отмывали двукратным центрифугированием сорбента в том же буфере. Затем к суспензии сорбента со связанными на нем антителами против актина добавляли в избытке раствор ^{125}I -белка А, инкубировали 10 мин, освобождались от свободного белка повторными промывками и последний осадок смывали из отрезанного кончика конической пробирки в сцинтиллятор для просчета радиоактивности.

Интересно отметить, что белок А не одинаково хорошо связывается с константной областью чистых IgG из крови разных животных. Например, IgG козы реагирует с белком А в 1000 раз менее эффективно, чем IgG кролика или человека. Вместе с тем, как было недавно показано, эта малая реакционная способность IgG козы увеличивается в 300 раз, если антитела находятся в составе иммунного комплекса с иммобилизованным антигеном, но не с антигеном в растворе [Langone, 1980]. Повидимому, молекула белка А надежно связывается при взаимодействии с двумя молекулами IgG козы, которые для этого должны быть фиксированы в непосредственной близости друг от друга.

КОНКУРЕНТНЫЕ РАДИОИММУННЫЕ МЕТОДЫ (КРИМ)

Именно эти методы количественного определения антигенов чаще всего подразумеваются в английской научной литературе при употреблении термина «radioimmunoassay» (RIA). Суть их заключается в следующем. Исследователь пользуется радиоактивно меченным антигеном, идентичным тому, который подлежит определению в препарате, и антисывороткой к этому антигену. Подбирают такое соотношение между ними, что в иммунной реакции радиоактивно меченный антиген оказывается в избытке, так что антисыворотка связывает лишь часть его стандартного исходного количества (50—80%). Доля связывания определяется после удаления иммунных комплексов из раствора (путем преципитации, фильтрования или сорбции) по соотношению радиоактивностей — исходной и связанной с комплексом (или оставшейся в растворе). Затем в серии предварительных экспериментов к описанной выше стандартной исходной смеси добавляют известные, возрастающие количества чистого немеченного антигена. Между мечеными и немечеными молекулами антигена возникает конкуренция за находящиеся в недостатке антитела. В результате этого меченые антигены в составе иммунных комплексов разбавляются немечеными

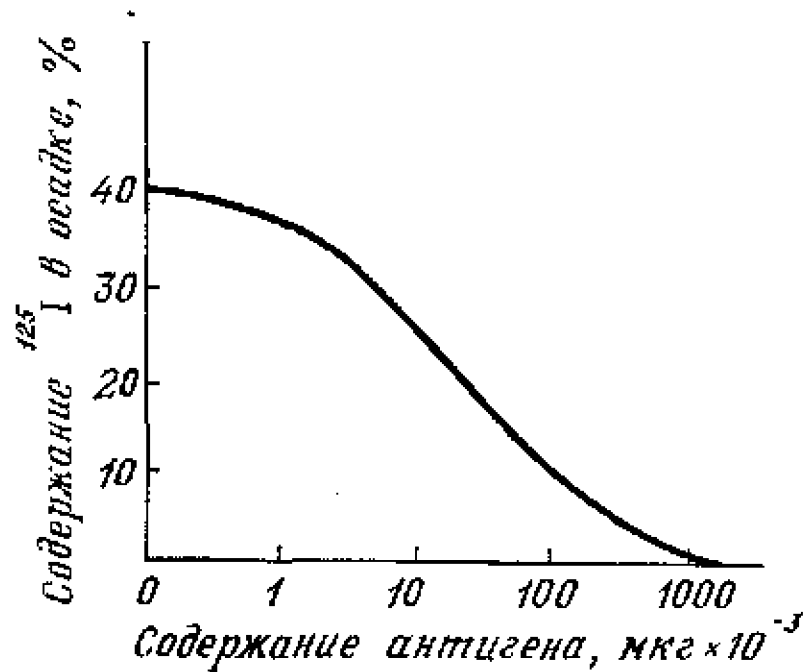


Рис. 73. Типичная калибровочная кривая для конкурентного радиоиммунного метода определения количества антигена

и соответственно снижается доля радиоактивности, выводимая этими комплексами из стандартного раствора.

Таким образом, можно построить калибровочную кривую (рис. 73), где по оси абсцисс откладывают количество (или концентрацию) вносимого «холодного» антигена, обычно в логарифмическом масштабе, а по оси ординат — долю исходной радиоактивности (в процентах), связывающейся в иммунном комплексе (или остающейся в растворе). Теперь для выяснения содержания данного антигена в исследуемом препарате достаточно добавить известный объем последнего к той же стандартной смеси радиоактивного антигена и антисыворотки, отделить иммунные комплексы от раствора и просчитать радиоактивности. Зная долю связавшейся радиоактивности, по калибровочной кривой легко определить абсолютное количество данного антигена в препарате.

Конкуренция между радиоактивно мечеными и немечеными молекулами антигена может осуществляться как при одновременном, так и при любом последовательном внесении их в инкубационную смесь. Компоненты иммунных комплексов непрерывно обмениваются, и в конечном счете пропорция меченых и немеченных антигенов в составе комплексов устанавливается точно такой же, как в растворе. Полезно отметить также, что количество антигена в препарате может во много раз превышать количество радиоактивного антигена в исходной стандартной смеси, но это не мешает его точному определению, до тех пор пока остающаяся в составе комплекса (пусть даже малая) доля исходной радиоактивности измеряется надежно. Это означает, что в стандартную смесь можно вносить очень малое абсолютное количество высокомеченного антигена и соответственно иметь высокую чувствительность метода. Чувствительность, очевидно, определяется минимальным количеством «холодного» антигена, внесение которого дает эффект уменьшения связанной радиоактивности, надежно заметный на калибровочной кривой ($\sim 10^{-3}$ мкг для рис. 73).

В целом конкурентный радиоиммунный метод (КРИМ) прост, дает хорошо воспроизводимые результаты и очень чувствителен — можно определять нанограммовые количества антигенов. Ниже рассмотрены примеры его использования, сгруппированные по способам удаления иммунного комплекса из раствора. Большая часть этих способов подробно рассмотрена выше.

КРИМ с преципитацией иммунного комплекса

Из общей характеристики метода ясно, что определенные антигены и антитела против них не могут находиться в эквивалентном (для преципитации) соотношении, так как антитела должны быть в недостатке. Пространственная сеть при этом не образуется, и для осаждения иммунного комплекса должны быть приняты специальные меры.

Простейшая из них — осаждение раствором сульфата аммония с концентрацией около 50% насыщающей. Сульфат аммония в такой концентрации осаждает как свободные γ -глобулины, так и иммунные комплексы. Для образования преципитата, как правило, приходится прибегать к соосаждению с носителем, в качестве которого можно добавить в смесь γ -глобулины неиммунной сыворотки кролика до концентрации 1,5—2 мг/мл. В составе этих глобулинов, разумеется, не должно быть антител, способных вступать в иммунную реакцию с определяемым антигеном.

Таким способом, например, определяли в гидролизате РНК содержание некоторых минорных нуклеотидов (t^6A и ms^2A). Антисыворотки против этих миноров были получены путем иммунизации кролика их конъюгатами с БСА. Метку 3H в каждой из миноров вводили по методу Рандерата путем периодатного окисления остатка рибозы и последующего восстановления его меченым боргидридом натрия (см. выше).

В 0,3 мл буфера (0,075 М NaCl + 0,1 М H_3BO_3 + 0,025 М $Na_2B_4O_7$, pH 8,3) вносили иммунную сыворотку и меченые миноры одновременно с немечеными (для калибровочной кривой) или с исследуемым гидролизатом РНК в пропорциях, продиктованных приведенными выше соображениями. Туда же для соосаждения в стандартных условиях вносили γ -глобулины кролика до суммарного содержания белка 0,5 мг. После инкубации в течение 1 ч при 37° смесь охлаждали, добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, перемешивали 30 мин при 0° и осадок собирали центрифугированием. Его промывали 50%-ным (от насыщенного) раствором сульфата аммония, растворяли в том же буфере и просчитывали радиоактивность. По ее уменьшению при добавлении в стандартную смесь исследуемого гидролизата определяли содержание в нем минорных нуклеозидов [Vold, 1979].

Часто для преципитации иммунных комплексов используют описанную в начале этой главы систему двух антител. Например, Форстнер и соавторы определяли этим способом содержание муцина в препаратах слизистой оболочки кишечника крысы. Антисыворотку кролика против чистого муцина концентрировали осаждением сульфатом аммония (с последующим диализом против фосфатно-солевого буфера) до 20 мг/мл. Метку тритием вводили, как и в предыдущем случае, по методу Рандерата в сахаридную часть муцина, который является гликопротеидом.

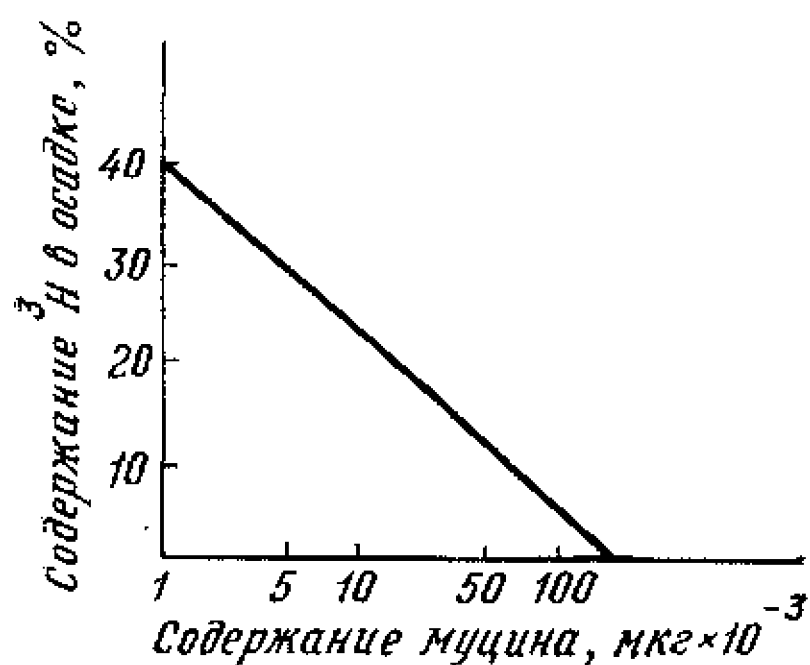


Рис. 74. Калибровочная кривая для определения содержания муцина в слизистой оболочке кишечника крысы [Forstner et al., 1977]

Для построения калибровочной кривой в инкубационную смесь вносили одновременно $0,5 \times 10^{-3}$ мкг [^3H]-муцина (14 000 расп./мин), от 0 до 0,2 мкг «холодного» муцина, 40 мкл разбавленной в 100 раз специфической антисыворо-

ротки к муцину (в недостатке!) и 96 мкл неиммунной сыворотки кролика (разбавленной в отношении 1:10). Последняя нужна только для того, чтобы обеспечить эквивалентное соотношение концентраций при последующей преципитации иммунных комплексов вторичными антителами. Здесь конкуренция меченого и немеченого муцинов происходила в самом ходе образования первичных иммунных комплексов. Инкубацию вели 1 ч при 37° . Затем добавляли неразбавленную антисыворотку козы против IgG кролика (продажный препарат) и смесь выдерживали 48 ч на холоду. За это время формировалась пространственная сеть преципитата. Его собирали низкоскоростным центрифугированием, промывали и просчитывали. На рис. 74 приведена калибровочная кривая из цитируемой работы. Ее почти линейный (в отличие от рис. 73) характер обусловлен тем, что на графике изображен только рабочий, близкий к линейному участок этой кривой. Чувствительность метода столь высока, что для количественного определения достаточно располагать участком слизистой оболочки площадью 2 мм^2 . Метод можно использовать для анализа биопсии у человека [Forstner et al., 1977].

Одновременную инкубацию обоих конкурентов (меченого и немеченого миозина) с первичными антителами использовали Кларк и соавторы для отбора моноклональных гибридом — продуцентов антител против миозина. Роль иммунной сыворотки в этих опытах каждый раз играли среды культивирования различных гибридом, полученных в результате слияния клеток селезенки крыс и мышей, иммунизированных миозином, и клеток миеломной линии P3-X63-Ag8. Инкубацию проводили в боратном буфере (pH 8,4), содержащем 40 мМ пироглутамата натрия, по 1% Тритона X-100 и дезоксихолата, а также 2% нормальной сыворотки крысы или мыши. Эту сыворотку вводили опять-таки ради создания эквивалентного соотношения концентраций при последующем добавлении вторичных антител в составе антисыворотки козы против иммуноглобулинов крысы или мыши. Используя для конкуренции миозин гомологичного и гетерологичного происхождения, авторы выясняли степень специфич-

В недавней работе по исследованию содержания кальмодулина (многофункционального регулятора ферментов, использующих кальций) авторы сначала образовывали немеченный иммунный комплекс, а потом вели вытеснение из него «холодного» кальмодулина радиоактивным.

В 0,3 мл фосфатно-солевого буфера, содержащего 0,05% Тритона X-10 и 3 мМ ЭГТА, 50 мкл разбавленной (1:50) иммунной сыворотки кролика инкубировали в течение 30 мин при 30° с возрастающими количествами (1—10 мкг) немеченого кальмодулина. Только после этого вносили меченный ^{125}I кальмодулин ($\sim 13\,000$ имп./мин), инкубировали смесь в течение 30 мин при той же температуре, а затем для достижения полного конкурентного равновесия ее выдерживали 24 ч на холоду. Добавляли 10 мкл неразбавленной антисыворотки козы против IgG кролика, инкубировали еще 14 ч, осадок собирали центрифугированием (20 000 g; 20 мин) и просчитывали в γ -счетчике. В точном соответствии с описанным построением калибровочной кривой осуществляли определение неизвестной концентрации кальмодулина в экстракте (до 60 мкг белка в препарате).

Иодирование кальмодулина в этой работе проводили с участием Хлорамина Т. Интересно, что антигенные свойства кальмодулина при иммунизации кролика улучшаются после присоединения к остаткам лизина в его молекуле динитрофенола из 1-фтор-2,4-динитробензола. Специфическую антисыворотку окончательно очищали на афинном сорбенте, полученном путем посадки кальмодулина на фирменный носитель «Affi-Gel 10» (фирмы «Bio-Rad»). Элюцию с него осуществляли 4 М тиоцианатом натрия [Wallace, Cheung, 1979].

Возможен и такой вариант постановки опыта, когда конкуренцию меченого и немеченого антигенов и даже само получение их иммунных комплексов проводят уже после образования пространственной сетки первичных и вторичных антител. Сначала смешивают в нужном соотношении специфическую антисыворотку кролика и антисыворотку козы против IgG кролика, инкубируют их для образования пространственной сетки, а потом вносят оба конкурирующих антигена. Такой прием, например, был использован при исследовании синтеза пептида, играющего роль «антифриза» в сыворотке крови рыб, живущих при -2° . Автор сначала смешивал по 50 мкл антипептидной сыворотки кролика, разбавленной в отношении 1:50, и антисыворотки козы против IgG кролика, разбавленной в два раза (все в среде, содержащей 0,01 М Na-фосфат, 0,5 М NaCl, 5 мкМ лейцин, 1% Тритона X-100 и 1% ДОХ-Na,— заметны меры по предотвращению неспецифической агрегации). Смесь инкубировали и уже после образования преципитата в нее вносили радиоактивно меченные продукты трансляции и конкурирующий с ними очищенный пептид [Lin, 1979]. Очевидно, что в такой постановке опыта можно с успехом использовать упомянутый выше готовый препарат «PR immuno-precipitating reagent».

Не менее удобно вводить вторичные антитела закрепленными на полиакриламидных гранулах «Immunobeads». В этом случае отпадает необходимость обеспечения эквивалентности концентраций первичных (в роли антигенов) и вторичных антител, а следовательно, и введения для этой цели дополнительной неиммунной первичной сыворотки. При использовании такого подхода КРИМ с двумя антителами становится особенно простым и удобным.

Еще раз отметим частое введение 1% Тритона X-100 и 1% ДОХ-Na. Они препятствуют неспецифической агглютинации, но не мешают образованию иммунных комплексов.

Естественно, что в конкурентном методе для осаждения иммунных комплексов находит широкое применение и второй из рассмотренных в начале главы современных подходов — использование бактерий *S. aureus* («Pansorbin») или «Protein A-Sepharose».

Например, в недавней работе по оценке содержания нейраминидазы из *Arthrobacter sialophilus* в 0,2 мл буфера вносили 50 мкл антисыворотки морской свинки против нейраминидазы в разбавлении 1:6000, различные количества очищенного фермента (для калибровочной кривой) или исследуемого препарата и 10^{-3} мкг [125 I]-нейраминидазы (135 000 имп./мин). Инкубацию вели в течение 3 ч при 23°. Для осаждения иммунных комплексов к инкубационной смеси добавляли 0,15 мл «Pansorbin». Через 10 мин осадок собирали центрифугированием. Следует обратить внимание на очень малое количество радиоактивного фермента и соответственно большое разбавление (1:6000!) антисыворотки, которая должна быть в недостатке. Такая высокая чувствительность метода возможна благодаря использованию высокоэффективного метода преципитации. Из рис. 75 видно, что в присутствии 2×10^{-3} мкг «холодной» нейраминидазы уровень радиоактивности, связанной с препаратом «Pansorbin», уже снижается до 70% от максимального, а в присутствии 10^{-2} мкг «холодного» фермента можно зарегистрировать радиоактивность около 25% от максимума [Huchzermeyer et al., 1980].

Для сопоставления рассмотрим еще одну работу по обнаружению кальмодулина конкурентным радиоиммунным методом, где для осаждения иммунных комплексов используется «Pansorbin». Инкубацию исследуемого препарата или известных количеств чистого антигена с антисывороткой овцы против кальмодулина проводили в 0,1 М боратном буфере (pH 8,4) с 0,06 М NaCl, 0,8 мМ EGTA и 16 мкг/мл БСА (конкурентное подавление неспецифической сорбции антигена) в течение 2 ч при 25° и ночи на холоду в присутствии 10 000 имп./мин [125 I]-кальмодулина. Затем добавляли 10 мкл «Pansorbin», инкубировали еще 30 мин при 25°, центрифугировали (10 000 g; 15 мин), осадки трижды промывали тем же буфером и просчитывали в γ-счетчике [Chaufouleas et al., 1979].

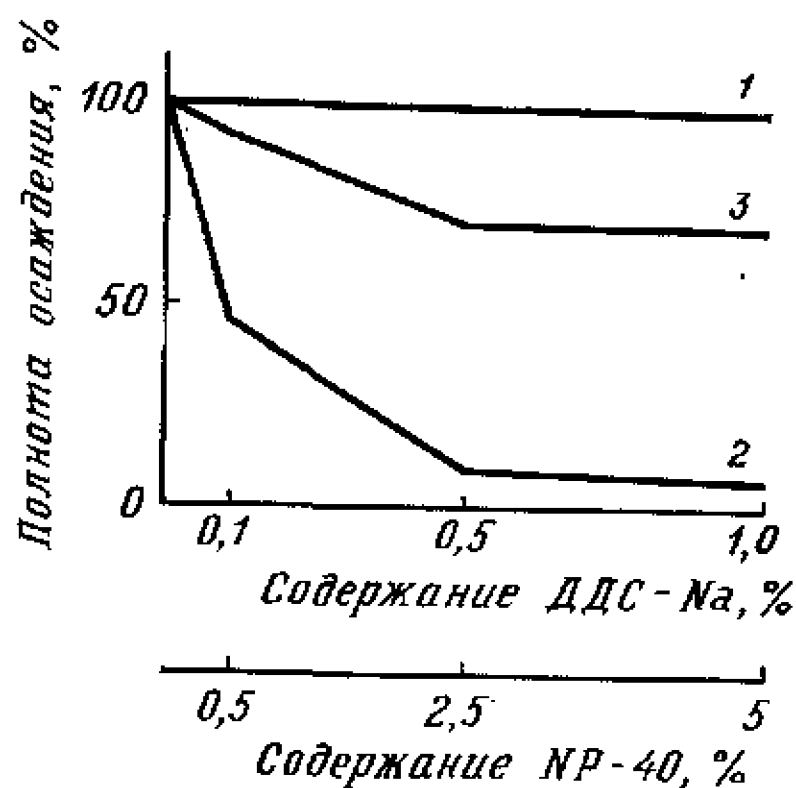
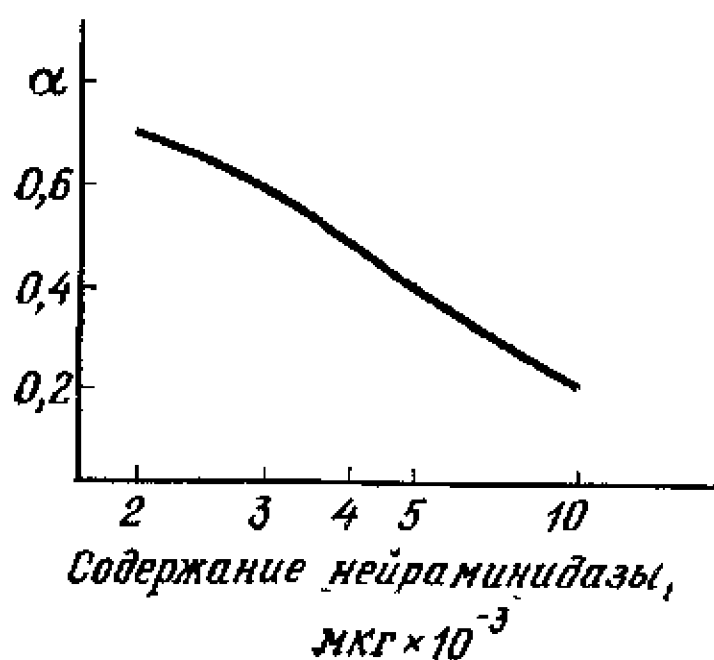


Рис. 75. Калибровочная кривая для определения содержания нейраминидазы в *Arthrobacter sialophilus* [Huchzermeyer et al., 1980]

α — доля от максимального связывания ^{125}I (в отсутствие «холодного» фермента)

Рис. 76. Осаждение иммунного комплекса в присутствии детергентов [Goelz et al., 1981]

1 — NP-40; 2 — ДДС-Na; 3 — комбинация NP-40 и ДДС-Na в тех же концентрациях

Ранее отмечалось, что ДДС-Na мешает образованию иммунных комплексов. Между тем, в некоторых случаях этот детергент существенно облегчает экстракцию белка, необходим для его растворения или для подавления неспецифической сорбции легко сорбирующегося белка. Все это относится, в частности, к нейрон-специфичному щелочному белку I из нервной ткани, где он содержится в концентрации меньше 0,001%. Поэтому при исследовании содержания этого белка была предпринята попытка использования КРИМ в присутствии ДДС-Na. Это оказалось возможным при условии, что одновременно в среду вводили пятикратный (против ДДС-Na) избыток нейтрального детергента NP-40. Образующиеся смешанные мицеллы успешно выполняли упомянутые защитные функции и, вместе с тем, не очень сильно снижали способность к образованию иммунных комплексов (рис. 76) [Goelz et al., 1981].

КРИМ с фильтрованием

Иммунные комплексы антиген—антитело, сорбированные на поверхности клеток *S. aureus*, можно вместо центрифугирования собирать фильтрованием через стекловолокнистый фильтр, на котором можно и просчитывать радиоактивность осадка.

Наказато использовал этот прием для обнаружения немеченого гибрида РНК—ДНК. Против такого гибрида удастся получить антисыворотку кролика. Как обычно для нуклеиновых кислот [Plescia, 1968], иммунизацию осуществляли его комплексом с метилированным альбумином. Интересно, что полученная анти-

сыворотка не взаимодействует с ДНК и РНК порознь, а «узнает» только гибридные молекулы. Меченный ^3H гибрид получали *in vitro* матричным синтезом РНК на однонитевой циркулярной ДНК фага $\phi\text{X-174}$.

После инкубации (37° , 30 мин) в объеме 0,55 мл иммунной антисыворотки (0,1 мкг IgG), 5 пмоль меченого гибрида (1800 имп./мин) и возрастающих количеств немеченого гибрида (до 100 пмоль) к инкубационной смеси добавляли 5 мкл 10%-ной суспензии *S. aureus* и оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 1 мл буфера и фильтровали через стекловолокнистый фильтр GF/F, предварительно вымоченный в том же буфере, содержащем еще БСА (0,1 мг/мл) и поливинилсульфат. Последние компоненты предназначены, по видимому, для насыщения центров сорбции стекла, для того чтобы помешать задержанию на фильтре меченого гибрида ДНК—РНК, не вошедшего в состав иммунного комплекса. Фильтр промывали 5%-ной ТХУ и этанолом, сушили, а затем просчитывали в 10 мл сцинтиллятора «Econofluor» после растворения задержанного на нем материала в 0,5 мл солибилизатора «Protosol» в течение 30 мин при 80° [Nakazato, 1979].

В этой работе задержание иммунных комплексов на фильтре было чисто механическим, за счет связывающих его бактерий, а сорбция на материале фильтра была явлением нежелательным. Однако существует и такой вариант КРИМ, когда задержание иммунного комплекса на фильтре происходит именно за счет сорбции. Это особенно удобно для антигенов небелковой природы, когда задержание на нитроцеллюлозном фильтре возможно только за счет антител, а они полностью входят в состав иммунных комплексов. Такой подход, например, был использован для обнаружения конкурентным методом минорного нуклеозида ($t^6\text{A}$) в составе полных гидролизатов различных тРНК [Khan et al., 1977].

Твердофазный КРИМ

Идея метода, завоевывающего все большую популярность, состоит в том, что один из компонентов иммунного комплекса химически или за счет сорбции надежно связан с неким твердофазным носителем, причем так, что не утрачивает своих иммунных свойств. Тогда образование иммунных комплексов и конкуренция между меченым и немеченым их участниками происходит на поверхности твердой фазы, которую затем легко промыть и просчитать в γ -счетчике.

По существу, твердофазная система использовалась уже довольно давно в виде геля, образованного самим белком-антигеном при сшивке его глутаровым альдегидом. На поверхность частиц измельченного гомогенизацией геля можно посадить специфические антитела так, что при этом будет занята лишь одна из двух областей связывания каждого антитела. За второе «посадочное место» может идти конкуренция меченых и немеченых

антигенов из раствора, что позволяет воспользоваться конкурентным радиоиммунным методом.

Однако такой подход не экономичен, поскольку требует расходования больших количеств чистого белка-антигена для образования геля. Естественнее использовать в качестве твердой фазы один из продажных гидрофильных гелей и на его поверхности химически закрепить антитела, за которые будет идти конкуренция. Такое закрепление можно осуществить, например, с помощью известной реакции активации сефарозы бромцианом. Она практически не нарушает иммунореактивности антител.

Использование сефарозы и ПААГ. Хамер и соавторы при определении β -глобина кролика получали для него антитела из антисыворотки козы и закрепляли их на BrCN-активированной сефарозе. Использовали [^{125}I]-глобин с УА 10 мКи/мг. К 50 мкл 20%-ной суспензии сефарозы с антителами в микропробирке добавляли 0,4 мл исследуемого препарата и осторожно перемешивали (переворачивали) в течение 44 ч на холоду. Затем в объеме 25 мкл вносили $0,2 \times 10^{-3}$ мкг [^{125}I]- β -глобина (5000 имп./мин), перемешивали так же, осаждали сефарозу центрифугированием, замораживали в сухом льду, кончик пробирки отрезали и просчитывали находящуюся в нем радиоактивность в двухканальном γ -счетчике [Hamer et al., 1979].

Операция промывки сефарозы от не связавшегося с ней меченого β -глобина в этом описании не пропущена — ее просто не проводили. Вместо нее авторы использовали изящный прием учета радиоактивности свободного β -глобина в просчитываемом кончике микропробирки. Одновременно с [^{125}I]- β -глобином в инкубационную смесь вносили 6000 имп./мин [^{59}Fe]-трансферрина, который, очевидно, не связывается с сефарозой. Это позволяло, просчитав во втором канале счетчика γ -излучение ^{59}Fe кончика пробирки, оценить ^{125}I -радиоактивность, находящуюся там в свободной жидкости. Для этого достаточно было выяснить отношение счета $^{125}\text{I}/^{59}\text{Fe}$ в аликвоте из супернатанта после осаждения сефарозы. Радиоактивность ^{125}I , связавшуюся с антителами на сефарозе, легко подсчитать вычитанием найденной свободной радиоактивности ^{125}I из суммарного счета иода в кончике микропробирки.

Закрепление антигенов на твердой фазе носителя упоминалось выше при рассмотрении иммуносорбентов, используемых для очистки антител. Такие сорбенты можно использовать и для количественных оценок, например, для определения концентрации специфических антител в растворе, где их содержание еще слишком мало, чтобы его можно было выявить обычными приемами титрования, описанными в части II. Такая задача возникает, например, в ходе отбора («сканирования») гибридом, синтезирующих нужные антитела. Находящиеся в недостатке антитела из раствора полностью переходят на иммуносорбент, где их легко обнаружить с помощью радиоактивно меченого белка А. Если последний взять в избытке и дать ему надежно прореагиро-

вать с «сидящими» на сорбенте антителами, а потом свободную радиоактивность отмыть, то активность, остающаяся на иммуносорбенте, может служить мерой количества антител. Белок А метят радиоактивным иодом, а сорбент прямо просчитывают в γ -счетчике.

Разумеется, здесь еще никакой конкуренции нет. КРИМ с использованием иммуносорбента с закрепленными на нем антигенами подобен рассмотренному выше варианту с гелем белка-антигена, сшитого глутаровым альдегидом. Как и там, антитела можно фиксировать на иммуносорбенте по одной области связывания (антигены на сорбенте закреплены и удалены друг от друга), а за вторую может идти конкуренция меченых и немеченных антигенов из раствора.

Есть прием, где конкуренция происходит не между свободными антигенами в растворе за «посадочные места» на закрепленных антителах, а наоборот — между двумя твердофазными матрицами с закрепленными на них антигенами за связывание из раствора находящихся там в недостатке антител. Главное условие процесса сохраняется — недостаток антител. Матрицы при этом должны поддаваться последующему физическому их разделению. Антигены, «сидящие» на одной матрице, образуют стандартную систему сравнения (это как бы «известная концентрация»); антигены, подлежащие определению, или известные количества антигена для калибровочной кривой «сажают» на вторую матрицу. Те и другие антигены — немеченные. Антитела распределяются между матрицами пропорционально количеству находящихся на них антигенов. Если затем матрицы разделить, то распределение антител можно выяснить с помощью обработки каждой из них избытком радиоактивно меченного белка А.

Недавно этот прием был использован для определения IgE (в качестве антигена) в крови человека. Для получения матрицы сравнения определенное количество IgE «сажали» с помощью карбодиимида на «Immunobeads» (см. выше). В качестве второй матрицы использовали «Protein A-Sepharose». На нее «сажали» сыворотку крови для определения в ней IgE. Сефарозу легко осадить из суспензии в условиях, когда «Immunobeads» еще остаются взвешенными. Тем самым происходит разделение матриц. В качестве антител были использованы продажные препараты IgG кролика против IgE человека [Langone et al., 1980].

Использование *S. aureus*. Выше было описано использование бактерий *S. aureus* для осаждения иммунных комплексов из раствора. Возможность такого использования связана с наличием в оболочках этих бактерий белка А, связывающего иммунные комплексы через остающиеся свободными константные участки антител, входящих в их состав. При использовании *S. aureus* в качестве твердофазной основы для КРИМ аналогичные события развиваются в ином порядке. Сначала с поверхностью бактерий связывают свободные антитела, сохраняющие при этом свою

иммунореактивность, а затем за образование комплекса с ними конкурируют радиоактивные и нерадиоактивные белки-антигены. После установления равновесия, отражающего соотношение тех и других антигенов в растворе, иммунные комплексы осаждают вместе с бактериями и просчитывают радиоактивность осадка, убывающую пропорционально увеличению концентрации нерадиоактивных антигенов. Таким образом, условия протекания реакций образования иммунных комплексов в двух сопоставляемых вариантах использования *S. aureus* различаются тем, что ранее эти реакции происходили в растворе, а сейчас речь идет о реакциях, идущих на «твердой» поверхности бактериальных клеток.

О'Киф и Беннет недавно использовали такой подход для обнаружения фактора роста в эпидермисе мыши. 0,5 мл 10%-ной суспензии убитых клеток *S. aureus* переводили в тот же объем буфера (0,01 М Na-фосфат, pH 7,5, с 0,1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА и 0,1% Тритона X-100). Затем туда добавляли 0,1 мл неразбавленной антисыворотки кролика, иммунизированного фактором роста, и смесь инкубировали 30 мин при 4°. От несвязавшихся компонентов сыворотки бактерии дважды отмывали тем же буфером (по 3,5 мл). Меченый фактор роста получали иодированием. Затем выясняли соотношение реагентов, обеспечивающее необходимый для конкуренции недостаток антител в реакции,— сначала в реакции с одним только меченым фактором роста.

К 20 мкл стандартизированного раствора меченого фактора роста добавляли в серии проб по 20 мкл 1%-ной суспензии *S. aureus*, где бактерии, «заряженные» иммунным IgG, последовательно разбавляли бактериями, несущими на своей поверхности неиммунный IgG нормальной сыворотки кролика. Каждую пробу инкубировали в 0,4 мл того же буфера в течение часа на холоду. Для снятия неспецифически сорбировавшихся антигенов бактерии промывали 3 мл раствора следующего состава: 2 М мочеви́на + 0,1 М глицин + 1%-ный Тритон X-100. Наконец, их осаждали и просчитывали радиоактивность.

Таким способом находили разбавление, при котором уровень связываемой бактериями радиоактивности снижался до 50—75% от полной радиоактивности исходного стандартного раствора меченого фактора роста. Далее, как обычно для КРИМ, в смесь стандартного раствора радиоактивно меченого фактора и найденного оптимального разбавления несущих антитела бактерий добавляли известные возрастающие количества «холодного» фактора роста и, аналогично предыдущему, по убыли осаждаемой радиоактивности строили калибровочную кривую. По этой кривой в тех же условиях определяли концентрацию фактора роста в исследуемом препарате [O'Keefe, Bennett, 1980]. Точно так же в качестве твердой фазы для КРИМ можно воспользоваться и «Protein A-Sepharose». Манипуляции с этим универсальным иммуносорбентом были описаны в начале главы.

Использование пластиков. Радиоиммунные методы сильно упростились и приобрели особенную привлекательность и популярность, когда выяснилось, что в качестве твердофазной основы для образования иммунных комплексов можно использовать обычные полистирол, поливинилхлорид и другие пластики, опираясь на явление сорбции белков на их поверхности.

Кантареро и соавторы исследовали сорбцию ряда меченных ^{125}I белков на стенках пробирок из полистирола в зависимости от концентрации белковых растворов. Сорбция шла из тонкого слоя, при вращении пробирок в течение 3 ч при 37° . Белки были растворены в 0,1 М карбонатном буфере, pH 9,6. Затем стенки пробирок тщательно промывали 0,9%-ным раствором NaCl с детергентом (0,05% Твин-20). Для семи белков (БСА, овальбумина, лактальбумина и четырех различных иммуноглобулинов) было найдено, что вплоть до концентрации 1 мкг/мл количество прочно сорбированного белка линейно зависело от исходной концентрации белкового раствора и составляло от 10 до 80% (IgM) вносимого в пробирку белка. Далее следовало насыщение или дополнительное связывание уже за счет взаимодействия типа белок—белок. Первоначальное (линейное) связывание покрывает поверхность полистирола монослоем молекул белка [Cantareo et al., 1980].

Романи и соавторы для проведения радиоиммунных определений различных белков хроматина, в частности НМГ-1, в качестве твердофазного носителя использовали гибкие платы для микротитрования на 96 лунок, изготовленные из полихлорвинила. В лунки вносили по 0,1 мл белкового раствора в обычном фосфатно-солевом буфере, выдерживали 4 ч при комнатной температуре, а затем ночь на холоду (концентрации белка указаны ниже). Не сорбировавшиеся на пластик белки смывали шестью порциями по 0,3 мл того же раствора. Для блокирования центров сорбции на пластике, оставшихся незанятыми, лунки заполняли 1%-ным раствором БСА в фосфатно-солевом буфере, инкубировали и отмывали, как описано выше. Затем в лунки вносили по 0,1 мл иммунной антисыворотки кролика, разбавленной в отношении 1 : 200 тем же раствором БСА, инкубировали 4 ч при комнатной температуре с покачиванием и промывали 8 раз буфером. Наконец, для обнаружения связавшихся антител добавляли по 0,1 мл раствора [^{125}I]-белка А (10—50 тыс. имп./мин), инкубировали еще 4 ч, трижды тщательно промывали раствором БСА, 8 раз — буфером и 10 раз — водой. После этого лунки вырезали из платы и поочередно просчитывали в γ -счетчике.

На рис. 77 приведена кривая нарастания связанной с пластиком радиоактивности в зависимости от концентрации антигена (НМГ-1) в исходном белковом растворе. Легко видеть, что при концентрации 2 мкг/мл имеет место насыщение сорбционной способности полихлорвинила.

Рассмотренный метод прямого обнаружения антигена позволяет обнаруживать 2×10^{-2} мкг НМГ-1 (0,1 мл при concentra-

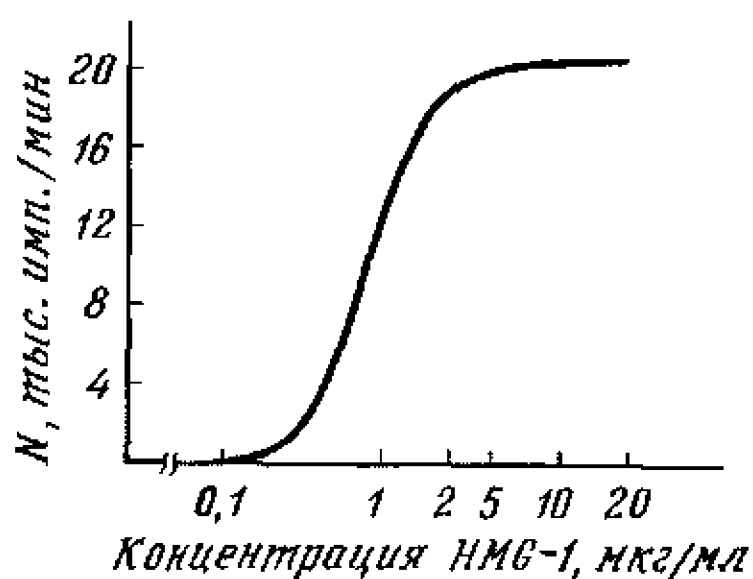


Рис. 77. Кривая связывания радиоактивности белка А с пластиком в зависимости от концентрации НМГ-1 в исходном белковом растворе (см. текст)

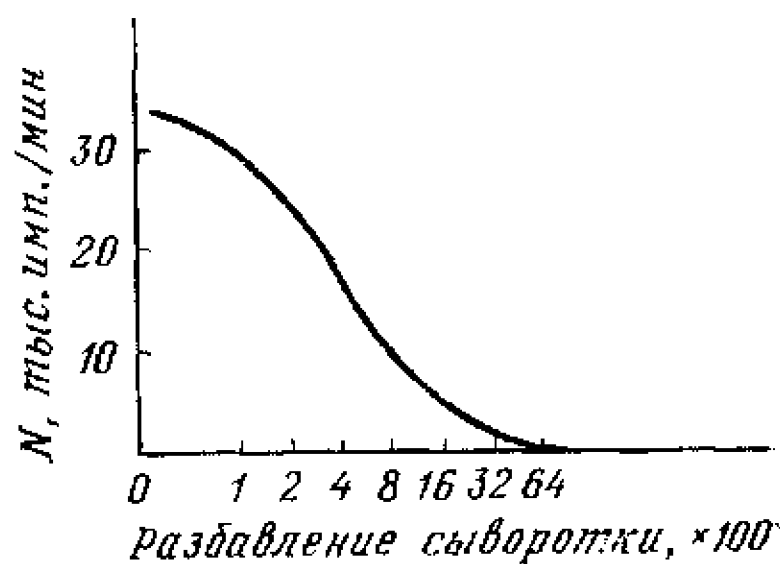


Рис. 78. Уменьшение радиоактивности, связанной на пластике, с разбавлением антисыворотки при условии, что пластик исходно насыщен антигеном (см. текст)

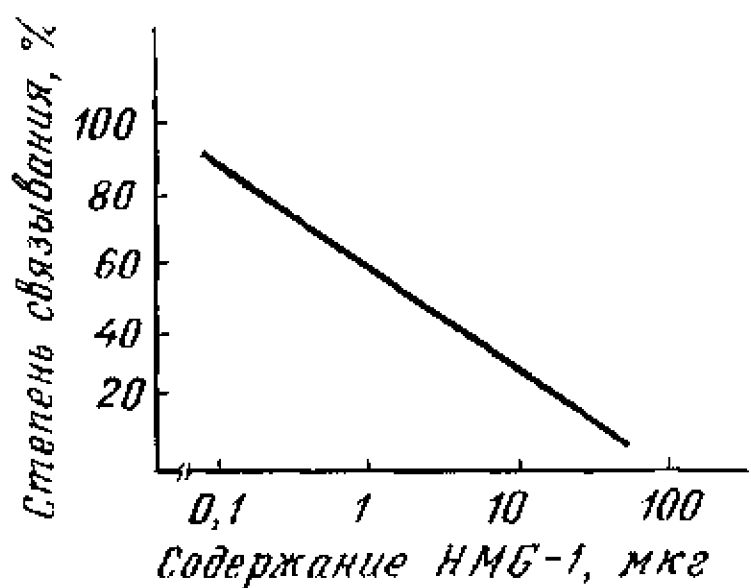


Рис. 79. Калибровочная кривая для КРИМ с использованием пластика в качестве твердой фазы при определении содержания НМГ-1 [Romani et al., 1980].

ции 0,2 мкг/мл). Его легко преобразовать в КРИМ. Для этого плату насыщали антигеном, сорбируя его из заведомо избыточной концентрации 10 мкг/мл. Испробовав различные разбавления сыворотки, можно было найти (рис. 78), что, начиная от разбавления 1 : 100, она в указанных выше условиях эксперимента оказывалась в недостатке — количество связываемой радиоактивности снижалось. Взятую в таком разбавлении антисыворотку предварительно инкубировали с равным объемом раствора антигена, варьируя его концентрацию в широких пределах (рис. 79). В ходе прединкубации часть антител связывалась с антигенами в растворе и не участвовала в образовании иммунных комплексов на поверхности пластика. Затем раствор прединкубированных антител вносили в лунки с сорбированным на их поверхности (до насыщения) антигеном и детектировали связавшиеся антитела радиоактивным белком А. Получалась типичная для КРИМ калибровочная кривая, по которой аналогичным образом можно было определять содержание антигена [Romani et al., 1980].

Аналогичный прием был использован для исследования гистонов [Blankstein et al., 1980; Benezra et al., 1981]. Здесь вместо [^{125}I]-белка А для детектирования связавшихся с пластиком антител использовали радиоактивно меченную антисыворотку козы против IgG кролика, т. е. систему двух антител.

В заключение отметим, что для удобства проведения серийных научных исследований, особенно медицинских, с помощью КРИМ фирмы-поставщики радиоактивных биохимических препаратов предлагают целый список готовых наборов («Radioassay Kits»). В эти наборы входят дозированные количества радиоактивного антигена, «холодного» антигена для построения калибровочной кривой и специфической антисыворотки, а также различные средства преципитации иммунных комплексов — от сульфата аммония и активированного угля (для цАМФ) до твердофазных носителей. Фирма «Beckman» разработала комплект приспособлений («Phase I»), облегчающих проведение таких серийных исследований. Помимо обычных автоматических дозаторов жидкости, в него входят специальные штативы, с помощью которых в приспособленном для этой цели крестообразном роторе обычной центрифуги «Beckman J6» можно центрифугировать одновременно 160 пробирок, простой γ -счетчик на 200 пробирок (в тех же штативах) и микропроцессор на 9 программ, печатающий окончательные результаты определения концентрации антигенов.

СКАНИРОВАНИЕ КОЛОНИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ

Брум и Гилберт использовали сорбцию белков на пластике для выявления колоний бактерий, продуцирующих определенный белок. К этому белку, используя его в качестве антигена, вырабатывали антисыворотку и ею смачивали поливиниловую пленку. IgG сорбируются на пластик так же, как другие белки. Колонии микроорганизмов, растущие на поверхности агара, лизировали в парах хлороформа или иным способом. На агар, слоем сорбированного белка вниз, накладывали пленку. В местах расположения колоний, продуцирующих искомые антигены, последние связывались со специфическими антителами и переходили на пленку. Затем пленку отмывали и обрабатывали радиоактивно мечеными антителами той же самой специфичности. Эти индикаторные антитела в составе иммунных комплексов фиксировались на пленке в местах нахождения антигенов, связываясь с ними по второму антигенному детерминанту. Затем следовала автораддиография пленки, выявлявшая эти места, а тем самым и положение искомым колоний на поверхности агара [Broome, Gilbert, 1978].

Похожий прием был описан примерно в то же время Эрлихом и соавторами. Эта работа уже цитировалась подробно по другому поводу. Вместо пластиковой пленки авторы использовали диазобумагу (см. часть II). В роли радиоактивного маркера выступал иодированный белок А. Его «сажали» на индикаторные антитела, которые в этом случае были немечеными. Подобно предыдущему, автораддиографией диазобумаги можно было установить положение искомым колоний — продуцентов нужного бел-

ка-антигена. Им был продукт трансляции встроенного в бактериальную плазмиду гена.

Во избежание связывания радиоактивного белка А с первым иммунным слоем последний формировали не из целых специфических антител, а из их фрагментов $F_{(ab')_2}$, полученных обработкой антител пепсином. Эти фрагменты, как известно, сохраняют способность связывать антигены, но не взаимодействуют с белком А. На рис. 30 изображена схема образующегося в местах расположения искомым колоний «сэндвича» [Erlich et al., 1978].

Диазобумагу (ДБМ-бумагу) можно использовать проще. Из лизатов бактерий на нее переводят все белки, а затем места локализации искомым антигенов выявляют, обрабатывая бумагу сначала раствором специфических первичных антител, а потом радиоактивно меченными вторичными антителами. Собственно говоря, это тот же самый прием использования системы двух антител, который был описан в части II для снятия иммунных реплик после электрофореза [Amster et al., 1980]. Вместо диазобумаги для такого сканирования можно использовать фильтровальную бумагу, активированную бромистым цианом [Clark et al., 1979; Kemp, Cowman, 1981].

Наконец, сканирование с помощью антигена, сорбированного на пластике, можно использовать для обнаружения лунок с гибридомами, ведущими синтез антител против этого антигена. Описанным выше способом отбирали гибридомы, продуцирующие антитела к некоему белку (фактору V), участвующему в коагуляции крови [Katzmann et al., 1981].

Изящный метод отбора колоний микроорганизмов или клеток в культуре, продуцирующих определенный антиген, связан с использованием индикаторных эритроцитов с закрепленным на их поверхности белком А. Такие клетки вносят в агар, на котором растет культура, одновременно с антисывороткой к нужному антигену и компонентом. Антитела через белок А связываются с поверхностью эритроцитов. В местах нахождения клеток, секретирующих антиген, он образует со связанными антителами иммунные комплексы. На них «садится» компонент, что приводит в конце концов к лизису эритроцитов. Искомые колонии или клетки-продуценты антигена обнаруживаются по красным ореолам в местах их локализации [Smith, Hammarström, 1979].

ФЕРМЕНТАТИВНО-ИММУННЫЕ МЕТОДЫ

Эти методы не имеют прямого отношения к использованию радиоактивных изотопов. Следует кратко упомянуть о них лишь как об альтернативе рассмотренных радиоиммунных методов. В английской литературе ферментативно-иммунные методы обозначают сокращенно «ELISA», т. е. «enzyme-linked immunosorbent assay». В последние годы они приобретают все большую популярность. Суть дела заключается в использовании в качестве вторичных антител продажной антисыворотки козы против им-

муноглобулинов кролика, с которой ковалентно связан фермент, способный вести хорошо известную и легко обнаруживаемую реакцию, например щелочная фосфатаза или пероксидаза. Эта связь такова, что не сказывается на иммунореактивности антисыворотки и на активности фермента.

Опыт ставят точно по схеме, описанной выше для радиоиммунных методов. Например, на полистироле сорбируют тестируемые антигены. К ним присоединяют специфические IgG кролика, а затем, вторым слоем, — связанную с ферментом антисыворотку козы. Теперь для обнаружения и количественной оценки последней, а тем самым и исходного антигена, полистирольную пластинку инкубируют с субстратом ферментативной реакции, например *n*-нитрофенилфосфатом в случае щелочной фосфатазы. В результате ферментативной реакции освобождается *n*-нитрофенол, концентрацию которого можно определить спектрофотометрически. Выбрав концентрацию первичных антител так, чтобы они были в недостатке, и проводя преинкубацию сначала с известными количествами несвязанного антигена (для построения калибровочной кривой), а потом с исследуемым препаратом, можно использовать конкурентный метод, как было описано для радиоактивно меченных вторичных антител [Kusich et al., 1980; Sogin, Hinkle, 1980].

В частности, таким образом исследовали содержание гистонов в нуклеосомах из эритроцитов цыпленка. Вторичные антитела были конъюгированы со щелочной фосфатазой [Romas et al., 1981]. Конъюгация вторичных антител с пероксидазой и их обнаружение в реакции с H_2O_2 и бензидином недавно были использованы для обнаружения дезоксиноклеотидилтрансферазы, очищенной из тимуса теленка [Bollum, Chang, 1981].

Недавно описан мягкий метод конъюгации ферментов с антителами, обеспечивающий почти полное сохранение активности обоих партнеров [O'Sullivan et al., 1979]. Он открывает дополнительные возможности для постановки иммунохимических экспериментов описанного выше типа в тех случаях, когда радиоактивно меченные вторичные антитела нужной специфичности отсутствуют в продаже или плохо переносят реакции иодирования.

Другая немаловажная область — иммунофлюоресцентный анализ (FIA — «fluoroimmunoassay») — еще дальше отходит от рассматриваемых в этой книге методов. Дело не только в характере индикаторов, которыми служат флюоресцирующие вещества, конъюгированные с антителами. Более существенно различие объектов исследования и экспериментальных приемов. Объектами здесь служат главным образом антигенные свойства поверхностей клеток или органелл, а среди приемов главную роль играют цитологические подходы с использованием флюоресцентных микроскопов и квантовых фотометров. Поэтому ограничимся лишь ссылками на две недавние работы в этой области [Gillis et al., 1979; Bustin, Neihardt, 1979].

НЕКОТОРЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАДИОАКТИВНЫХ ИЗОТОПОВ

В заключение следует дать несколько практических рекомендаций общего характера. Они недостаточно многочисленны и слишком разрознены, чтобы составить отдельную главу, но и не связаны непосредственно с материалами, изложенными в предыдущих главах. Поэтому приведем эти замечания в виде краткого приложения, в порядке простого перечисления.

1. При исследовании активности фермента радиоактивный субстрат реакции должен находиться в количественном избытке, для того чтобы скорость реакции зависела только от наличия фермента, а присутствием эндогенного субстрата в неочищенной ферментной фракции можно было пренебречь. Обеспечивать весь избыток субстрата за счет радиоактивного препарата дорого и не имеет смысла, так как внесение в реакционную смесь радиоактивности порядка 0,1 мкКи обычно вполне достаточно. Даже при включении в конечный продукт всего лишь 1% субстрата это даст надежно измеряемое значение — 2200 расп./мин. Поэтому, как правило, следует разбавлять исходный радиоактивный препарат «холодным» субстратом, причем сразу для всего количества изотопа планируемой серии экспериментов — не только в интересах надежности сопоставления результатов разных опытов, но и ввиду того, что разбавленные препараты лучше хранятся (меньше сказывается радиационный эффект разрушения препарата).

УА разбавленного препарата, как правило, можно подсчитывать, пренебрегая молярным содержанием самого меченого вещества, так как разбавление происходит в 1000 и более раз.

2. Следует иметь в виду существование изотопного эффекта, т. е. изменения хода реакции или физико-химических характеристик ее продукта за счет замены нормального атома на радиоактивный изотоп, отличающийся по своей массе. Практически с этим обстоятельством иногда приходится считаться при использовании трития, атомная масса которого втрое больше, чем у водорода.

3. Следует учитывать возможность необратимой сорбции изотопа на стекле или целлюлозе (например, на старте при ТСХ). Она может быть особенно заметна при использовании разбавленных растворов радиоактивных препаратов с высокой УА. Предотвратить ее лучше всего разбавлением изотопа «холодным» препаратом или введением немеченого вещества (белка, НК), не участвующего в реакции, но конкурирующего с меченым препаратом в отношении сорбции. Например, на старт пластинки для ТСХ иногда бывает целесообразно предварительно нанести немного «холодного» препарата, а потом уже — смесь радиоактивных веществ, подлежащих разделению.

Инертные в данной реакции полимерные «носители» широко употребляются для соосаждения меченых препаратов из раз-

4. Для обнаружения пятен радиоактивных веществ на пластинках после ТСХ или электрофореза не всегда удобно пользоваться автордиографией или флюорографией. При малом уровне радиоактивности это отнимает много времени. Значительно проще добавить в исходную смесь избыток «холодных» «свидетелей», разумеется, если состав смеси известен (аминокислоты, нуклеотиды и др.). Соответствующие пятна и полосы в этом случае легко локализовать окраской, а затем вырезать, элюировать или соскрести с пластинки и просчитать радиоактивность в жидком сцинтилляторе.

5. Ферментативные реакции с радиоактивными предшественниками сейчас нередко проводят в очень малых объемах (5—20 мкл). При этом возникают трудности с быстрым и надежным перемешиванием компонентов инкубационной смеси. Его лучше всего производить при нулевой температуре, а момент начала реакции фиксировать прогреванием смеси, которое для малых объемов проходит достаточно быстро. Проблему испарения из малого объема в процессе инкубации иногда решают, проводя реакцию в запаянном капилляре.

Останавливать реакцию, идущую в столь малом объеме, удобнее добавлением ингибитора или разбавлением относительно большим объемом холодного буфера, а уже потом — осаждением с инертным носителем.

6. Иногда третий в процессе реакции, идущей в водной среде, в результате преобразований субстрата может сниматься и обмениваться с водородом воды. Это можно установить перегонкой и измерением радиоактивности конденсата. В таком случае иногда спасает положение замена равномерно меченного тритием субстрата препаратом, меченным в известных (устойчивых) положениях.

7. УА, указываемая фирмами для своих препаратов, ненадежна. Известны случаи, когда ошибка достигала 500%. Следует проверять УА приобретаемых препаратов (но не по УФ-поглощению, так как возможно присутствие сильно поглощающих примесей) или пользоваться разбавленными препаратами со столь значительным избытком «холодного» вещества, чтобы УА можно было считать только по нему (см. выше). Разумеется, сам разбавитель должен быть надежно чистым.

8. Наличие радиоактивных загрязнений в исходном препарате можно обнаружить методом изотопного разбавления. В этом случае оно не дает пропорционального уменьшения включения метки.

Следует иметь в виду, что меченые препараты нередко поставляются в 50%-ном этаноле, а некоторые реакции ингибируются присутствием даже малых концентраций этанола (например, матричный синтез РНК).

9. Не следует забывать о радиоактивном распаде не только фосфора и иода, но и трития. Период полураспада для него равен

12 годам, так что длительное хранение исходных препаратов может заметно сказаться на их УА.

10. Для изучения кинетики ферментативных реакций бывает необходимо обеспечить очень быструю их остановку в отбираемых аликвотах. Это можно осуществить, перенося аликвоту на очень сильно охлажденные (почти до температуры жидкого азота) фильтры с последующей сушкой в вакууме без оттаивания перед дальнейшей промывкой. Описано простое приспособление для этой цели [Leech et al., 1978].

11. Хранить препараты, меченные ^{14}C , ^{35}S и ^{32}P (в наиболее разбавленном для дальнейшей работы виде), следует при максимально низкой температуре. Однако меченные ^3H препараты лучше хранить при 2° и не замораживать, потому что при замораживании в водном растворе препараты концентрируются, а это может ускорить их авторадиилиз. Для более сильных β -излучателей концентрирование роли уже не играет — они и в растворе «обстреливают» друг друга достаточно эффективно.

ЛИТЕРАТУРА

- Остерман Л. А., Адлер В. В., Бибилашвили Р. Ш., Савочкина Л. П., Варшавский Я. М.—Биохимия, 1966, 31, с. 398—404.
- Airhart J., Kelley J., Brayden J. E. et al.—Anal. Biochem., 1979, 96, p. 45—55.
- Albright E. B., Nowak I. S., Munro H. N.—Ibid., 1978, 91, p. 258—263.
- Aloyo V. J.—Ibid., 1979, 99, p. 161—164.
- Amster O., Salomon D., Zemel O. et al.—Nucl. Acids Res., 1980, 8, p. 2055—2065.
- Arnold H.-H., Siddiqui M. A. Q.—Biochemistry, 1979, 18, p. 647—654.
- Bearden J. C.—J. Biochem. and Biophys. Meth., 1980, 2, p. 34—37.
- Benezra R., Blankstein L. A., Stollar B. D., Levy S. B.—J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 6837—6841.
- Bhattacharya S., Sarkar N.—Biochemistry, 1981, 20, p. 3029—3034.
- Blankstein L. A., Stollar B. D., Levy S. B.—Anal. Biochem., 1980, 104, p. 168—172.
- Bollum F. J., Chang L. M. S.—J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 8767—8770.
- Bolton A. E.—In: Amersham, radiochemical reviews. 1977. (Radioiodination techniques; Rev. N 18).
- Bolton A. E., Hunter W. M.—Biochem. J., 1973, 133, p. 529—539.
- Bonner W. M., Laskey R. A.—Europ. J. Biochem., 1974, 46, p. 83—88.
- Bonner W. M., Stedman J. D.—Anal. Biochem., 1978, 89, p. 247—256.
- Bray D., Brownlee S. M.—Ibid., 1973, 55, p. 213—221.
- Brinster R. L., Brunner S., Joseph X., Levey J. L.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 1927—1931.
- Broome S., Gilbert W.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1978, 75, p. 2746—2749.
- Bryant M. L., Nalewaik R. P., Tibbs V. L., Todaro G. J.—Anal. Biochem., 1979, 96, p. 84—89.
- Buisson M., Reboud A.-M., Reboud J.-P.—Ibid., 1976, 75, p. 656—659.
- Burckhardt J., Birnstiel M. L.—J. Mol. Biol., 1978, 118, p. 61—79.
- Burckhardt J., Telford J., Birnstiel M. L.—Nucl. Acids Res., 1979, 6, p. 2963—2971.
- Bustin M., Neihardt N. K.—Cell, 1979, 16, p. 181—189.
- Cantarero L. A., Butler J. E., Osborn J. W.—Anal. Biochem., 1980, 105, p. 375—382.
- Chafouleas J. G., Dedman J. R., Minijaal R. P., Means A. R.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 10262—10267.
- Chamberlain J. P.—Anal. Biochem., 1979, 98, p. 132—135.
- Changas G., Reem G. H.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 4233—4237.
- Chen E. Y., Roe B. A.—Anal. Biochem., 1978, 89, p. 45—59.
- Cheung A. H., Bensadoun A., Cheng C.-F.—Ibid., 1979, 94, p. 346—357.
- Cheung D. T., Benya P. D., Gorn A., Nimni M. E.—Ibid., 1981, 116, p. 69—74.